

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«___» _____ 2020 р.

**Дипломний проєкт
на здобуття ступеня бакалавра
за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
на тему: «Технологія виробництва альфа-амілази. Дільниця біосинтезу»**

Виконала:

студентка IV курсу, групи БТ-62

Вершиніна Катерина Юріївна _____

Керівник:

Проф., к. ф-м. н.

Литвинов Григорій Сергійович _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення
технологічного процесу:

Ст. викл., к.т.н.

Фесенко Сергій Вікторович _____

Рецензент:

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студент (-ка) _____

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проєкт	2	
2	A4	ДП 6202. 00.000 ПЗ	Пояснювальна записка	85	
3	A1	ДП 6202. 01.000 ТК	Технологічна схема	1	
4	A1	ДП 6202. 02.000 ТК	Апаратурна схема	1	
5	A1	ДП 6202. 03.000 ТК	Ферментер	1	

				ДП 6202 00.000.00		
	ПБ	Підп.	Дата	Відомість дипломного проєкту		
Розробн.	Вершиніна К.Ю.					
Керівн.	Литвинов Г. С.					
Консульт.						
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.					
					Лист	Листів
					1	1
					КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-62	

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«_27_» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Вершиніній Катерині Юрїївні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва альфа-амілази. Дільниця біосинтезу.», керівник проєкту Литвинов Григорій Сергійович, к.ф-м.н, проф., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с
2. Термін подання студентом проєкту _____
3. Вихідні дані до проєкту: рекомбінантний штам-продуцент *Aspergillus oryzae*; середовище культивування – середовище на основі крохмалю з мальтозою та солями; ферментер для промислового культивування - об'єм 6,3 м³; параметри культивування: $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, аерація, $\tau = 7$ діб; спосіб очистки продукту – осадження, стабілізація, діаліз; кінцевий продукт – порошок сірого кольору вологістю 13%, фасований у zip-lock пакети.
4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва ферментного препарату; провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему

отримання продуценту, що використовується у проєкті; визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції ферментеру, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду ферментеру – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1

6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Фесенко С.В., ст. викл. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	26.02.20-10.03.20	
2.	Біохімічні основи виробництва	11.03.20-25.03.20	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	26.03.20-11.04.20	
4.	Технологічна частина	12.04.20-26.04.20	
5.	Складання апаратурної схеми	27.04.20-14.05.20	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	15.05.20-29.05.20	
7.	Оформлення пояснювальної записки	30.05.20-02.06.20	

Студент

Катерина ВЕРШИНІНА

Керівник

Григорій ЛИТВИНОВ

РЕФЕРАТ

Дипломний проект містить: 85. ст., 6 рис., 6 табл., 3 кресл., 49 посилань.

Робота присвячена виробництву ферментного препарату альфа-амілази для використання у сільськогосподарській та харчовій промисловості, що випускається у формі сірого порошку.

В якості продуцента альфа - амілази було обрано штам *Aspergillus oryzae*, отриманий в результаті штучного добору з використанням ультрафіолетового випромінювання в якості фізичного мутагена.

На основі фізіолого-біохімічних характеристик продуцента було обрано ферментер із механічним перемішуючим пристроєм(турбінною мішалкою) та барботером, які забезпечують надходження кисню до культури та ефективний масообмін в ході виробничого біосинтезу.

Для виділення та очистки продукту було запропоновано фільтрацію, осадження, стабілізацію і діаліз. Висушування продукту відбувається на промисловій вакуумній сушарці з метою уникнення руйнування та втрати активності антибіотика.

Розроблено технологічну та апаратурну схему виробництва ферментного препарату Амілоризин Г10Х у відповідності до вимог до готової форми та якості продукту, розраховано і накреслено ферментер для проведення процесу біосинтезу. Передбачено всі необхідні вимоги охорони праці і навколишнього середовища.

ФЕРМЕНТНІ ПРЕПАРАТИ, АСКОМІЦЕТИ, *ASPERGILLUS ORYZAE*, ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ, АЛЬФА-АМІЛАЗА, АМІЛОРИЗИН Г10Х, МЕТОДИ ОЧИСТКИ ПРОДУКТУ, МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ.

					ДП 6202. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Вершиніна К. Ю.				РЕФЕРАТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	5	85
Керівник	Литвина Г.С.				КПІ ім. Ігоря Сікорського			
Затвер.					ФБТ			

REPORT

The diploma project contains: 85. p., 6 Fig., 6 table., 3 drawing., 49 references.

The work is devoted to the production of an enzyme preparation alpha-amylase for use in the agricultural and food industry, produced in the form of a gray powder.

A strain of *Aspergillus oryzae* obtained by artificial selection using ultraviolet radiation as a physical mutagen was selected as the alpha - amylase producer.

Based on the physiological and biochemical characteristics of the producer, a fermenter with a mechanical mixing device(turbine agitator) and a bubbler was selected, which provide oxygen supply to the culture and effective mass exchange during production biosynthesis.

Filtration, precipitation, stabilization, and dialysis have been proposed to isolate and purify the product. The product is dried on an industrial vacuum dryer to avoid destruction and loss of activity of the antibiotic.

The technological and hardware scheme of production of the enzyme preparation Amilorizin G10X in accordance with the requirements for the finished form and quality of the product has been developed, the fermenter for carrying out the biosynthesis process was calculated and drawn. All necessary requirements for labor and environmental protection are provided.

ENZYME PREPARATIONS, ASCOMYCETES, *ASPERGILLUS ORYZAE*, PRODUCTION BIOSYNTHESIS, ALPHA-AMYLASE, AMYLORIZIN G10X, METHODS OF PRODUCT PURIFICATION, METHODS OF OBTAINING INDUSTRIAL PRODUCERS.

					ДП 6202. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	REPORT	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Вершиніна К.Ю.				Д	6	85
Консульт.								
Керівник		Литвинов Г. С.				КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		
Затвер.								

ЗМІСТ

ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	10
1.1 Основні промислові продуценти	10
1.2 Систематичне положення	12
1.3 Морфолого – цитологічні та культуральні ознаки	12
1.4 Фізіолого – біохімічні ознаки.....	12
1.5 Поширення в природі.....	16
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	18
2.1 Характеристика кінцевого продукту	18
2.2 Схема хімічних перетворень	19
2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології	22
2.4 Методи очистки цільового продукту.....	22
2.5 Механізм впливу цільового продукту на біохімічні процеси	23
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ.....	25
3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту	25
3.2 Загальні методи створення високопродуктивних промислових штамів	26
3.2.1 Розсів на агаризовані середовища, які містять різні селективні агенти для виявлення активних варіантів штаму	27
3.2.2 Селекція з використанням агаризованих середовищ на основі «голодного» агару	28
3.2.3 Виділення активних клонів при розсіві на селективні середовища культуральної рідини продуцента, отриманої при глибинному культивуванні	28
3.2.4 Селекція методом відбору активних варіантів в процесі глибинного культивування на напівсинтетичних середовищах, дефіцитних за вмістом солей	29
3.2.5 Генна інженерія.....	29
3.3. Схема отримання продуцента	30
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	32
4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва	32
4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....	34
4.3. Опис технологічного процесу	39
4.4 Матеріальний баланс виробництва.....	50

					<i>ДП 6202. 00.000 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробив</i>		<i>Вершиніна К. Ю.</i>			<i>ЗМІСТ</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>
<i>Консульт.</i>						<i>Д</i>	<i>7</i>
							<i>85</i>
<i>Керівник</i>		<i>Литвина Г. С.</i>				<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ</i>	
<i>Затвер.</i>							

4.5 Контроль виробництва.....	54
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	61
5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.....	61
5.2 Технологічний, конструктивний, тепловий розрахунки	64
5.2.1 Технологічний розрахунок.....	64
5.2.2 Тепловий розрахунок.....	65
5.2.3 Розрахунок перемішуючого пристрою	70
5.3 Вибір загальнозаводського обладнання	71
5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища	72
ВИСНОВКИ	76
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	79

ВСТУП

Альфа-амілаза є одним з найбільш широко використовуваних ферментних препаратів на сьогоднішній день. Вона користується великим попитом у різних галузях промисловості. Потреба українського виробництва на сьогоднішній день покривається вже існуючими підприємствами, що займаються виробництвом альфа-амілази, однак ферментний препарат є дорогим, і у його виробництві не задіяні підприємства малого і середнього бізнесу. Тож актуальність даного дипломного проекту полягає у розробці проекту з виробництва альфа-амілази для середнього бізнесу та виготовленні альфа-амілази з підвищеною ферментативною активністю, що дозволить скоротити її витрати на виробництві.

Рід *Aspergillus* належить до класу евриміцетів і включає в себе більше ста видів, які широко розповсюджені по всьому світі. Цей рід широко використовується у промисловості для виробництва ферментних препаратів, для виробництва продуктів харчування. Таких, як sake, соєвий соус, соєва паста. Також, представники даного роду володіють здатністю розщеплювати крохмаль, на відміну від представників сахароміцетів[1].

Відомо, що гриби роду аспергілів здатні до синтезу великої кількості корисних для людини продуктів, при тому не потребують якихось важких для створення умов культивування та не потребують проведення дороговартісних та довготривалих генних модифікацій. Аспергіли здатні до синтезу низки органічних кислот, а також синтезують велику кількість активних ферментів, в основному, класу гідролаз[2]. Так, на основі *Aspergillus oryzae* було синтезовано альфа – амілазу у промислових масштабах, ферментативна активність якої є вище, ніж у альфа – амілази, синтезованої з використанням роду *Bacillus*, а також більш стійкої до дії несприятливих чинників. Також, *Aspergillus niger* є широко відомим

					ДП 6202. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП		
Розробив	Вершиніна К.Ю.						
Консульт.							
Керівник	Литвина Г.С.						
Затвер.					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	9	85

продуцентом лимонної кислоти і не тільки у промислових масштабах[3].

В даному дипломному проекті увагу буде приділено представнику роду *Aspergillus*, а саме *Aspergillus oryzae*, як продуценту одного з найбільш застосовуваних у світі ферментів – альфа-амілазою. Було обрано саме цього представника роду через його природню здатність до синтезу високоактивної альфа – амілази і відсутність потреби до значного генетичного модифікування. Також не останню роль у виборі продуценту відіграла невибагливість у субстраті і швидкість росту міцелія.

Тому метою даного проекту є удосконалення існуючих технологій виробництва альфа – амілази із використанням грибів роду *Aspergillus* з підвищеними ферментативними властивостями.

Для досягнення поставленої мети були поставлені наступні завдання:

- Обґрунтувати вибір високопродуктивного штаму гриба виду *Aspergillus oryzae* на основі дослідження морфолого-фізіологічних та культуральних особливостей грибів цього виду;
- охарактеризувати кінцевий продукт та біохімічні перетворення в ході його отримання;
- підібрати методи отримання промислового високопродуктивного штаму *Aspergillus oryzae*;
- запропонувати шляхи удосконалення технології виробництва препарату грибної альфа - амілази;
- скласти технологічну та апаратурну схеми виробництва та підібрати відповідне обладнання;
- розрахувати апарат, який би задовольняв умови тепло-масообміну при проведенні біосинтезу культури *Aspergillus oryzae*, виконати його креслення;
- передбачити всі необхідні вимоги щодо охорони праці та охорони навколишнього середовища на виробництві, пов'язаному з отриманням препарату Амілоризин Г10Х.

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		10

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1 Основні промислові продуценти

Альфа – амілаза на сьогоднішній день посідає перше місце за інтенсивністю використання серед інших позаклітинних ензимів. Вона активно застосовується у харчовій, спиртовій, текстильній промисловості, пивоварінні та медицині.

Альфа – амілази можливо ізолювати з абсолютно різних біологічних джерел: тварин (слинна або панкреатична амілаза), злакових (ячмінь, пшениця), грибів (*Aspergillus*) і бактерій (*Bacillus*). До бактеріальних альфа – амілаз належать такі, що працюють за нормальних температур (*B. subtilis*), і за дуже високих температур (*B. licheniformis*)[4].

У промисловому масштабі для синтезу альфа – амілаз використовуються штами *B. subtilis* та *A. oryzae*. Препарати, відповідно, носять назви амілосубтилін та амілоризин. Ці амілази не належать до термостабільних ферментів, тому методами мутагенезу та селекції було одержано високопродуктивний штам *B. licheniformis* 103[5].

Серед особливостей *Bacillus subtilis*, які варто враховувати при культивуванні, можна виділити здатність закислення середовища, розповсюдженість у навколишньому середовищі і відсутність патогенності по відношенню до людини[6].

Серед особливостей *Aspergillus oryzae* можна виділити те, що більш активно гриб росте на зерновій сировині, а саме на ячмені, пшениці, кукурудзі[7].

Bacillus licheniformis є мікроаерофілом, він є нешкідливим для теплокровних тварин, стійкий до літичних ферментів, технологічний для виробництва, стабільний при зберіганні та екологічно безпечний[8].

					ДП 6202. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА		
Розробив	Вершиніна К. Ю.						
Консульт.							
Керівник	Литвина Г. С.						
Затвер.					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	11	85

При аналізі ряду досліджень, які були виконані для аналізу альфа – амілаз, синтезованих *B. subtilis* та *A. oryzae* і вивчено їх субстратну специфічність та стійкість до різних хімічних речовин, було виявлено, що альфа – амілаза, що продукується *A. oryzae*, найефективніше гідролізує розчинний картопляний та пшеничний крохмаль та має дуже низьку здатність до гідролізу пулуану, в той час як амілаза, що продукується *B. subtilis* найефективніше гідролізує пшеничний крохмаль і взагалі не діє на пулуан. Ензими обох продуцентів не розщеплюють мальтозу, α -циклодекстрин і декстран 500. Вплив обох амілаз перевірявся на мальтозі, сахарозі, трегалозі, декстрині, α - та β -циклодекстрині, амілозі, амілопектині, глікогені, пулуані, розчинному та нерозчинному картопляному крохмалі, кукурудзяному, пшеничному крохмалі і на декстрані 500. Вивчення впливу хімічно активних речовин на активність досліджених ензимів показало, що амілази *A. oryzae* і *B. subtilis* є стійкими до сечовини, дезоксихолевої кислоти, Твіну-80, Тритону X-100 та пероксиду водню, тобто вони є конкурентоспроможними з раніше описаними ензимами. З усього вищесказаного, можна зробити висновок, що амілаза, синтезована *A. oryzae*, здатна розщеплювати більше видів вуглеводчистих субстратів та із більшою ефективністю, ніж аналогічна амілаза, продукована *B. subtilis*[9] .

Що стосується особливого штаму *B. licheniformis* 103, про який йшла мова вище, то цей штам є селективно виведеним в лабораторії, тому на даний час немає в широкому доступі інформації про наявний налагоджений процес промислового синтезу амілази цим штамом. Його використовують в лабораторіях при синтезі невеликих об'ємів продукту. Можливо, найближчим часом буде описана методика промислового використання цього штаму і ми отримаємо нові можливості з новим високоефективним продуцентом і більш термостабільною альфа – амілазою.

Проаналізувавши переваги і недоліки відомих промислових продуцентів альфа – амілази було обрано мікроорганізм, який буде використовуватися як

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		12

промисловий продуцент у даному дипломному проєкті. Ним став *Aspergillus oryzae*

1.2 Систематичне положення

Aspergillus oryzae належить до царства грибів, підцарства вищих.

Відділ: Аскомікотові гриби

Підвідділ: *Pezizomycotina*

Клас: Євроціоміцети

Підклас: *Eurotiomycetidae*

Порядок: Євроціальні

Родина: Аспергілові

Рід: Аспергіл

1.3 Морфолого – цитологічні та культуральні ознаки

Колонії пухнасті, округлої форми, краї рівні, міцелій білого кольору, спороутворюючий, колір колонії від оливкового до темно – зеленого. Вегетативний міцелій септований, добре розгалужений з великими здуттями, товщина гіф 6-12 мкм. Формування конідій відбувається екзогенно, поверхня конідії гладенька, форма округла, діаметр спор 5-6 мкм. Утворює конідіальні головки з одноярусними стеригмами.

Повітряний міцелій зі значним спороношенням темно-зеленого кольору. По краях колонії білий пухнастий міцелій. Колір субстратного міцелію – білий. Колір зворотньої сторони колонії – світло – коричневий. Пігменти не виділяє. Колір колонії із віком темнішає, стає буро – зеленим[10].

1.4 Фізіолого – біохімічні ознаки

Є аеробом. Оптимальною температурою росту є 28-30⁰С. Максимальна температура – 50⁰С, мінімальна – 18⁰С. Оптимальне значення рН для росту гриба – 5,5. Ріст гриба відмічається в діапазоні рН від 2,5 до 10,0.

Для вирощування даного продуцента можуть використовуватись середовища наступного складу:

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		13

- ячмінне борошно 3,0%, пшеничні висівки 3,0%, крохмаль 2,0%, K_2HPO_4 1,5%
- пшеничне борошно 6,0%, пшеничні висівки 2,0%, K_2HPO_4 1,5%
- соєве борошно 6,0%, ячмінне борошно 5,0% , K_2HPO_4 1,5 %
- соєве борошно 6,0 %, пшеничні висівки 2,0 %, K_2HPO_4 1,5%
- середовище Чапека з з крохмалем наступного складу : $NaNO_3$ – 1г/л, KH_2PO_4 – 1г/л , KCl – 0,5г/л, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5г/л, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,015г/л, нерозчинний картопляний крохмаль -10г/л, H_2O – до 1л

Культивування здійснюється в колбах Ерленмейера на 750 см³ на круговій качалці з кількістю обертів 220 об/хв за температури 30°C.

Джерело вуглеводів	Активність альфа амілази, од/мл
Глюкоза + крохмаль	241 +/- 0,7
Сахароза + крохмаль	145 +/- 0,9
Декстроза + крохмаль	240 +/- 0,3
Крохмаль	130 +/- 0,9
Мальтоза + крохмаль	250 +/- 1,2
Лактоза + крохмаль	141 +/- 0,9
Фруктоза + крохмаль	136 +/- 0,7

Таблиця 1.1 Вплив різних джерел вуглеводів з індукованим крохмалем на біосинтез альфа амілази культурою *A. oryzae*[11]

Як видно з таблиці 1.1 , найбільш активною є амілаза, що була синтезована на середовищі мальтози з крохмалем.

Концентрація мальтози, %	Концентрація крохмалю, %	Активність амілази, од/мл
0,5	0,5	116 +/- 0,5
	1	176 +/- 1,3
	1,5	232 +/- 0,9
	2	250 +/- 70,7
1	0,5	78 +/- 0,9
	1	321 +/- 1,2
	1,5	296 +/- 0,8
	2	274 +/- 0,7
1,5	0,5	63 +/- 0,2
	1	286 +/- 0,4
	1,5	261 +/- 0,9
	2	276 +/- 1,1
2	0,5	309 +/- 0,7
	1	296 +/- 0,9
	1,5	116 +/- 0,8
	2	76 +/- 0,5

Таблиця 1.2 Вплив різних концентрацій джерел вуглеводів на біосинтез альфа – амілази[11]

Як видно з таблиці 1.2, ферментативна активність варіюється від 63 од/мл до 321 од/мл. Найбільша активність амілази відмічається у варіанті, в якому міститься в якості джерела вуглеводів 1% мальтози з додаванням крохмалю в концентрації 1% від об'єму середовища. Це говорить про те, що така комбінація є найбільш успішною для синтезу активної альфа – амілази[11].

В якості джерела вуглеводів гриб використовує крохмаль, глюкозу, цукрозу, ксилозу, мальтозу, маніт, гліцерин і лактозу. Асимілює нітрати, амонійний і амінний азот, білки. Є не патогенним. Зберігається на агаризованому солодовому суслі 8% СВ, рН середовища – природній, температура зберігання +20-25⁰С. Чисту культуру можна вирощувати на середовищі із сусло - агару

Раніше вважалося, що *A. oryzae* може розмножуватись нестатевим шляхом за допомогою мітозу, а саме шляхом диспергування спор з використанням конідієносців. Але нещодавно було виявлено, що цей аскоміцет містить ген альфа – спарювання в своєму геномі, що доводить можливість розмноження статевим шляхом. Незважаючи на це, нестатеве

розмноження стоїть в пріоритеті в усіх умовах навколишнього середовища і дуже рідко коли використовується статеве розмноження[12].

Представники роду *Aspergillus* відрізняються від інших тим, що в них використовується первинна і вторинна метаболічні системи. Функціональність цих систем залежить від карбонових кислот, які розпадаються на ланки жирних кислот, які складаються з унікального набору синтазних комплексів. Ці ланки допомагають у формуванні і розвитку клітинної мембрани і везикул для зберігання ферментів. Енергію для первинного метаболізму гриб отримує від контакту із зерном чи крохмалем. Для вторинного метаболізму використовуються кислотні сполуки для пригнічення метаболічних шляхів, що дозволяє *A. oryzae* продукувати вторинні метаболіти. Ці метаболіти дозволяють аскоміцетові змінювати себе в залежності від середовища нинішнього існування, тобто, вони здатні збільшувати чи зменшувати свою пристосованість до навколишніх умов для того, щоб забезпечити оптимальну метаболічну ефективність, що дає грибу можливість адаптовуватися до дуже широкого кола середовищ[13].



Рисунок 1.1 *A. oryzae*, що росте на зернах рису[14]

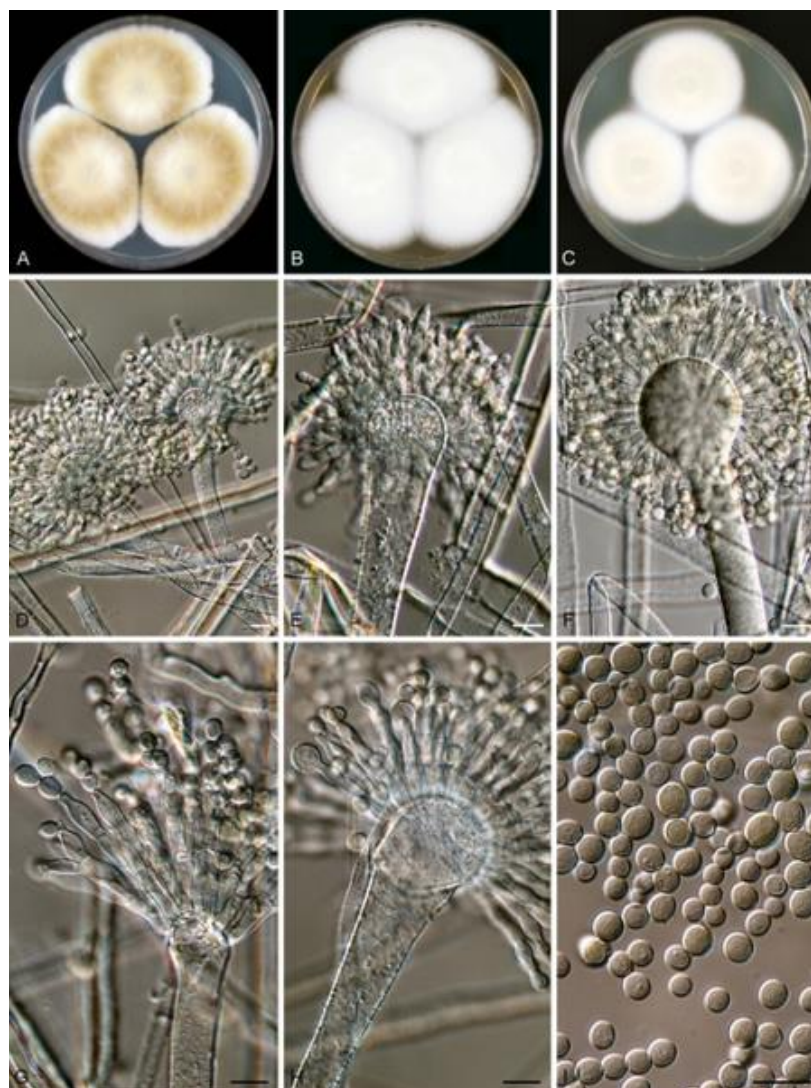


Рисунок 1.2 Морфологія гриба *A. oryzae*[15]

1.5 Поширення в природі

Своє походження бере з вологих регіонів Східної Азії, тому вперше був використаний саме там, для виробництва продуктів харчування Японії та Китаю. Використовується у виробництві різних харчових продуктів, починаючи від соєвого соусу і закінчуючи оцтом та саке, відомою японською рисовою горілкою[15].

Має здатність рости всюди, де присутня висока осмотична концентрація, стійкий до дії зовнішнього середовища. Можна знайти практично всюди, росте як пліснява на поверхні субстрату. Росте на багатих вуглеводами субстратах. Є розповсюдженим заражаючим фактором крохмалевмісних продуктів. Також, окрім росту на джерелах вуглеводів може демонструвати

ріст на бідних на необхідні речовини поживних середовищах, або в умовах повної відсутності ключових поживних речовин.

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1. Характеристика кінцевого продукту

Кінцевий продукт представляє собою тонкоподрібнений порошок бежевого або світло – сірого кольору вологістю не більше 13%, добре розчинний у воді без стороннього запаху та смаку.

Продукт призначений для застосування в основному у харчовій промисловості, в основному у хлібопекарській промисловості, де є основним ферментним препаратом, у крохмале-патоковій промисловості, у виробництві борошняних кондитерських виробів з метою прискорення процесів бродіння і корегування фізичних властивостей клейковини борошна, зміни реологічних властивостей тіста, прискорення його дозрівання, а також при виробництві пива по класичній технологічній системі[16].

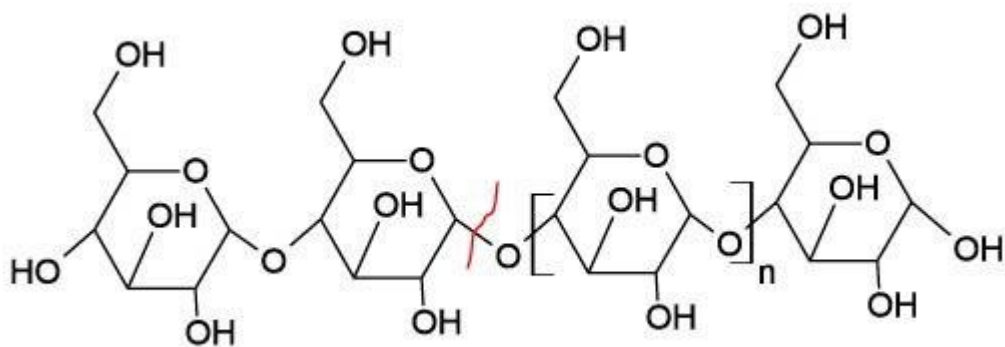


Рисунок. 2.1 Альфа-амілаза. Принцип дії – розрив відміченого на рисунку зв’язка[17]

Альфа-амілаза представляє собою олігосахаридну ендоглікозидазу, фермент, який розщеплює внутрішній глікозидний зв’язок всередині полі- чи

					ДП 6202. 00.000 ПЗ				
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розробив	Вершиніна К.Ю.				РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА		Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.							Д	19	85
							КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівник	Литвинов Г. С.								
Затвер.									

олігосахариду. У випадку альфа-амілази це 1,4-зв'язок між двома глюкозними фрагментами, розщеплює зв'язок С-О між вуглеводнем С₁ та киснем, хоча 1,4-зв'язок розщеплюється випадково(рис. 2.1)[18].

Для активності альфа-амілази необхідний кальцій, хоча повна активність відзначається лише за наявності певних аніонів, таких як СІ⁻, фосфат – іони та інші. Багато тканин організму здатні до синтезу альфа-амілази, але форми, що містяться в сироватці, найчастіше продукуються підшунковою залозою та слинними залозами. Цей фермент можна знайти у різних рідинах організму і це один з небагатьох ферментів, що в нормі присутній у сечі здорової людини[19].



Рисунок 2.2 Молекулярна структура альфа-амілази *Aspergillus oryzae*[20]

Альфа-амілаза, продукована *A. oryzae*, представляє собою глікопротеїн з 478 амінокислотних залишків і має молекулярну масу приблизно 50 кДа. Молекула складається з трьох структурних доменів, структура стабілізується чотирма дисульфідними зв'язками. Для активності ферменту необхідне зв'язування з кальцієм. Два сайти зв'язування розташовані поряд з активним центром[21]. За синтез фермента у гриба відповідає ген *amyR*, який є активатором початку синтезу альфа-амілази[48].

2.2 Схема хімічних перетворень

Як відомо, альфа – амілаза, також відома як КФ 3.2.1.1, або альфа – 1,4 – глюкан – глюканогідролаза, є ендоамілазою, яка викликає гідролітичне розщеплення альфа – 1,4 – глікозидних зв'язків випадковим чином всередині високополімеризованого субстрату і вивільняє глюкозу в альфа – аномірній формі. При цьому відбувається стрімке зменшення молекулярної маси полісахарида та в'язкості його розчинів, а також втрата здатності крохмалю реагувати з йодом. Фермент є глобулярним білком, який відноситься до кальцієвих металопротеїнів. Йони кальцію стабілізують структуру альфа – амілази і перешкоджають її денатурації.

Фермент альфа-амілаза, що синтезується безпосередньо *Asp. oryzae*, має молекулярну масу 52,5 кДа.

Відомо, що різним грибним амілазам властиве явище синергізму для швидкого переведу нативного крохмалю в цукри, що швидко засвоюються клітинами[22].

Попередник альфа-амілази має пропептид на С – кінці, який, можливо, відповідає з транслокацію зовнішньої мембрани. На відміну від передбачуваного β -ствола аутотранспортерів, цей С-кінцевий пептид демонструє значний вміст α -спіралі. Він зв'язаний з ферментом неупорядкованим лінкером і не має значної взаємодії з каталітичним доменом[23].

Рядом досліджень було показано, що альфа-амілаза має два попередники. Було показано, що кінці поліпептидних ланцюгів на полісомах, що були виділені із зерен рису, що проростають у неклітинній системі трансляції можуть направляти синтез на необроблений поліпептид, що містить сигнальну послідовність (перший попередник), а також на неглікозилірований поліпептид, що є другим попередником і на повністю оброблений поліпептид і повністю глікозильовану форму, тобто на саму альфа-амілазу. Для того, щоб оцінити афінність зв'язування фермента із субстратом, був використаний аналог субстрату, циклодекстрин. Результати

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		21

показали, що обидва попередники, при зв'язку із субстратом, набувають здатності перетворюватися безпосередньо у альфа – амілазу.

Ще раніше було показано, що під час біосинтезу відбувається розщеплення NH_2 -кінцевої сигнальної послідовності молекули – попередника з наступним глікозилюванням білка. Трансляція poly(A)^+ mRNA у неклітинній системі приводить до синтезу зароджуючихся молекул альфа амілази, що приєднують сигнальну послідовність (попередник 1). Формування неглікозильованої форми альфа-амілази, від якої була відщеплена сигнальна послідовність, відбувається за допомогою тунікаміцмну, специфічного інгібітора глікозилювання білка[24].

Незважаючи на значні успіхи, досягнуті в області визначення третинної структури гідролітичних ферментів, досі неможливо визначити всі центри зв'язування субстрату, каталітично активні залишки амінокислот в поліпептидному ланцюзі, а також їх індивідуальну роль в процесах розщеплення субстрату.

Найбільш вірогідним механізмом дії фермента є механізм подвійного заміщення, який було запропоновано Кошландом у 1953 році, модифіковано Маккартером – Уітерсом у 1994 та Девісом у 1995. Згідно цього механізму, пара залишків амінокислот розташовується один навпроти одного. Після утворення фермент – субстратного комплексу за рахунок ковалентного зв'язування полісахаридного фрагмента з другим амінокислотним залишком (каталітичним нуклеофілом), перший амінокислотний залишок дає протон для розщеплення глікозидного зв'язку. Потім фермент-субстратний комплекс гідролізується водою у реакції вторинного заміщення. Доведено, що обидва заміщення протікають через утворення проміжного оксокарбонієвого іона[25].

Для культивування продуцента у середовищі необхідна присутність джерела вуглеводів, мінеральні солі фосфорнокислого калію, додаткові джерела білка та детергенти. Такий склад середовища направлений на

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		22

збільшення синтезу окремих ферментів і підвищенні їх секреції з клітин. В якості джерела вуглеводів пропонується крохмалевмісна сировина[26].

2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

В основі промислового препарату Амілоризин П10Х міститься комплекс ферментів амілолітичної і протеолітичної дії, найбільше значення з яких має альфа-амілаза. Окрім амілаз, в препараті також міститься мальтаза та декстриназа[27].

Препарат високоочищеної амілази має амілолітичну активність 5 040 – 5 400 од., а також містить:

- білок 70-71%
- вуглеводи 12-13
- пептиди 8-10%
- волога 6-7%
- зола 3-4%

2.4. Методи очистки цільового продукту

Зазвичай на виробництві не застосовується певна технологія очистки ферментного препарату. Метод очищення є досить простим, складається з таких етапів, як осадження спиртом, потім стабілізація іонами Ca^{2+} , висолювання сульфатом амонію та діалізу. Препарат, очищений таким чином, можна використовувати у харчовій та медичній промисловостях через його клас чистоти[28].

Також на сьогоднішній день вченими було підібрано методи виділення і очистки, які включали в себе: фракціонування сульфатом амонію, гель-

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		23

фільтрацію на TSK-гелі Toyopearl HW-50 та іонобмінну хроматографію на TSK-гелі DEAE-Toyopearl 650 M. За допомогою цього методу ферментний препарат було очищено в 37 разів[29].

2.5. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Амілаза є важливим і життєво необхідним ферментом у організмі людини, тварин і рослин. Також вона знайшла широке застосування у промисловості, як було сказано вище.

Завдяки своїм властивостям вона є яскравим діагностичним засобом у організмі людини при аналізі результатів лабораторних досліджень. В людському організмі вона виробляється підшлунковою залозою та слинними залозами. В організмі завжди присутня амілаза у певній досить сталій кількості. При захворюванні чи запаленні підшлункової залози вона може виділятися в кров. Занадто низьке значення теж не є добрим. Високий чи низький рівень амілази у крові може бути ознакою раку підшлункової залози. Також високий рівень може бути ознакою при раку легень чи яєчників.

Іншими причинами високого вмісту амілази в крові можуть бути гострий чи хронічний панкреатит, холецистит, макроамілаземія, гастроентерит, прободна виразка, трубна вагітність, інфекція слинних залоз чи кишкова непрохідність. Навпаки, низький рівень може свідчити про прееклампсію, пошкодження підшлункової залози, захворювання нирок.

Також альфа-амілаза широко застосовується як добавка у корм для свійських тварин і не лише підвищує засвоюваність певних компонентів корму, діючи на важкогідролізуємі компоненти, але й здатна збільшувати рекомендовану норму вводу недорогої сировини, «багатої» на непоживні фактори без значного впливу на здоров'я і продуктивність тварин. Альфа-амілаза здатна швидко діяти на крохмаль, зменшуючи його в'язкість і викликаючи його розклад на олігосахариди.

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		24

Наявність цього ферменту у рослинних організмах дозволяє рослинам накопичувати поживні речовини про запас у вигляді крохмалю, і переживати таким чином несприятливі умови існування.

Для мікроорганізмів він дозволяє суттєво розширити діапазон поживних середовищ, на яких вони здатні існувати.

У промисловості альфа-амілаза використовується у спиртовій і харчовій промисловості для розщеплення крохмалю в зернах на цукри. В спиртовій промисловості це особливо важливо для пришвидшення процесу бродіння. Також використовується у складі миючих засобів та засобів видалення крохмалю

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
						25
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту

На сьогодні вивчення аскоміцетів є дуже важливим напрямком у дослідженнях, адже серед їх представників є промислові продуценти важливих для людини сполук. Вони активно використовуються в промисловості, в галузях агропромисловості, медицини, харчової промисловості.

Дуже перспективною є родина Аспергілові. Вона є однією з найпоширеніших в світі. Представники цієї родини використовуються у промисловості для продукування великої кількості ферментів, серед яких таназа, амілаза, пектолітичні ферменти. Також за допомогою даних продуцентів можна отримувати вітаміни біотин, B1, B2, такі лікарські засоби, як фумагілін та інші. Також дані цвілеві грибки активно використовуються у виготовленні соєвого соусу та рисової горілки.

Нещодавно було секвеновано геном *A. oryzae*, яке було виконано за допомогою підходу цілісного генома (WGS). В ході аналізу було виявлено, що 37 – Мб геном містить в загальному 12 074 гена, які кодують білки довжиною більш ніж 100 амінокислотних залишків. Також було виявлено, що геном складається з восьми хромосом.

У геномі було виявлено гени *trpB38* і *hisHF39*, що відповідають за регуляцію СРСА, гени категорії E COG, які пов'язані з транспортом і метаболізмом амінокислот, гени категорії J, які пов'язані з трансляцією, структурою рибосом і біогенезом. гени родини *Puf40*, які регулюють трансляцію мРНК і розпад мРНК шляхом зв'язування з 3'-послідовностями UTR[30].

					ДП 6202. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив	Вершиніна К. Ю.				РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	85
Керівник	Литвина Г. С.					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ	
Затвер.							

Тож, виходячи з усього сказаного вище, можна зробити висновок, що геном *A. oryzae* досить добре вивчений, і його вивчення триває.

3.2 Загальні методи створення високопродуктивних промислових штамів

Традиційна селекція мікроорганізмів (бактерій і грибів) заснована на експериментальному мутагенезі і відборі найбільш продуктивних штамів.

Невід'ємною частиною роботи є проведення селекції з метою відбору найбільш активних варіантів штаму. Даний етап необхідний як для первинної селекції «диких» штамів, так і при проведенні індукованого мутагенезу і підтримуючої селекції колекцій мутантних і рекомбінантних штамів.

Першим етапом у будь – якій селекційній роботі з грибами є штучний добір штамів «дикого» типу, які є перспективними для подальшої селекційної роботи. До ознак, які враховуються при відборі, можна віднести:

- швидкість росту на поживних середовищах
- рівень продукування цільового продукту

Для отримання високопродуктивного штаму *A. oryzae* головними критеріями відбору буде кількість амілази, що продукується, її ферментативна активність, хімічна стабільність та термін накопичення максимальної кількості біомаси.

З цією метою в джерелах можна знайти такі методи створення продуцента:

- Розсів на агаризовані середовища, які містять різні селективні агенти для виявлення активних варіантів штаму
- Селекція з використанням агаризованих середовищ на основі «голодного» агару
- Виділення активних клонів при розсіві на селективні середовища культуральної рідини продуцента, отриманої при глибинному культивуванню

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
						27
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- Методи генної інженерії
- Селекція методом відбору активних варіантів в процесі глибинного культивування на напівсинтетичних середовищах, дефіцитних за вмістом солей

3.2.1 Розсів на агаризовані середовища, які містять різні селективні агенти для виявлення активних варіантів штаму

Популяції культур мікроорганізмів є гетерогенними і розщеплюються при розсіві на агаризовані середовища на ряд клонів, які відрізняються за морфологією – культуральними, фізіологічними властивостями і ферментативної активності. Неоднорідність спорових популяцій значно посилюється у процесі зберігання штамів.

Для дослідження складу популяції використовують розсів спорової суспензії на селективні середовища. Оскільки природна мінливість культур неоднаково проявляється на різноманітних селективних середовищах, а розсів на велику кількість середовищ це важка і дорога робота, для визначення селективних середовищ, на яких морфологічна мінливість буде виражена найбільше, використовують посів штаму у вигляді гігантських колоній (ГК). Посів в такому вигляді дозволяє отримати інформацію про вплив складу середовища на морфологічні ознаки культури, на склад популяції і розщеплення на морфологічні ознаки, на склад популяції і ступінь розщеплення на морфологічні варіанти. Наступний розсів найбільш активних ділянок ГК на агаризовані середовища методом розведень дозволяє виділити окремі клони з максимальним рівнем активності цільового фермента.

На основі отриманих результатів було обрано середовища на основі солей Чапека з крохмалем чи сахарозою. Середовище Чапека дає можливість відбору активних клонів по відношенню зони гідролізу субстрата і діаметру колонії. Розсів спорової суспензії на середовище Чапека з крохмалем надалі успішно використовується для первинної якісної оцінки активності окремих клонів на різних етапах мутагенезу.

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
						28
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Відбір активних мутантних клонів проводили з використанням трьох агаризованих середовищ:

- середовище Чапека + 3% крохмалю для відбору по зоні гідролізу
- середовище СА для відбору по морфологічним ознакам
- середовище СА + 2% кукурудзяного екстракту, так як збагачення середовища компонентом, що є джерелом органічного азоту, вітамінів та інших ростових факторів, може призвести на подальше розщеплення відібраного штаму на різні варіанти

Також проводиться дослідження реакції штаму, висіяного на середовищі Чапека, на УФ-випромінювання.

Відібрані клони пересівають у вигляді ГК на середовище Чапека з 3% крохмалю для накопичення біомаси, потім здійснюється перевірка фермента відібраних мутантів при глибинному культивуванні в колбах.

3.2.2 Селекція з використанням агаризованих середовищ на основі «голодного» агару

Використовується метод висівання суспензії спор на чашки Петрі з середовищем ГА(голодний агар) з подальшим нашаруванням на поверхню середовища з клонами, що вирости, повноцінного середовища Чапека. Метод засновано на гіпотезі, що вирощування на «бідному» середовищі та в умовах лімітування по кисню в шарі агаризованого середовища, дозволить відібрати найсильніші та швидкоростучі варіанти з активною ферментативною системою.

Застосування даного методу дозволяє не тільки відібрати варіанти з активністю, що на 10-15% перевищує активність вихідного штаму, але і стабілізує культуру за рахунок виключення зі складу популяції клонів з низькою активністю[31].

3.2.3 Виділення активних клонів при розсіві на селективні середовища культуральної рідини продуцента, отриманої при глибинному культивуванні

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
						29
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

В процесі культивування мутантних штамів на природних середовищах проводиться відбір клітин у різних стадіях розвитку з наступним висівом на селективні середовища.

Штам вирощують в колбах на борошняному середовищі на основі гідролізата пшеничного і соєвого борошна, відбір культуральної рідини для розсіву на селективні середовища здійснювали у стаціонарну фазу росту продуцента(на 120 год).

Розсів культуральної рідини на агаризоване селективне середовище Вельтьє дозволив виділити із загальної популяції мутантного штаму з рівнем активності 280 – 300 од/мл варіанти з активністю 320 – 340 од/мл.

3.2.4 Селекція методом відбору активних варіантів в процесі глибинного культивування на напівсинтетичних середовищах, дефіцитних за вмістом солей

Одним з ефективних способів селекції активних продуцентів є відбір вегетативних клітин з культуральної рідини в період стресового стану культури, яке може бути викликане культивуванням мікроорганізму в умовах лімітування одного з параметрів процесу, наприклад при культивування на середовищах з дефіцитом мінеральних солей, або в режимі різкого вуглеводного чи кисневого голодування.

В ході експерименту було встановлено, що культивування на середовищах, не збалансованих за основними джерелами харчування, викликає дегенеративний розвиток гриба, що візуально виражається в призупинці росту і локального утворення конгломератів міцелія різної форми.

При використанні цього методу було отримано позитивні результати. Більшість клонів, відібраних при культивування штаму на середовищі Чапека і її варіантах з наступним висівом на селективні агаризовані середовища, володіли високим рівнем продуктивності, який не залежав від часу відбору проб[32].

3.2.5 Генна інженерія

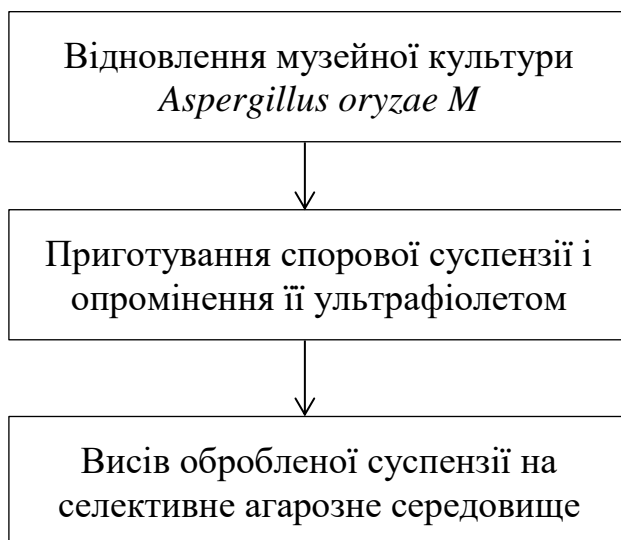
					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		30

Такий вид селекції застосовується з метою підвищення числа копій генів цільових ферментів і направленої зміни у механізмі регуляції синтезу цих ферментів.

Розглянемо на прикладі патенту. Створення рекомбінантного штаму на основі мутантного штаму *A.oryzae* ВКМ F-3927 D проводили у кілька етапів. На першому етапі з використанням індукованого муагенезу було отримано ауксотрофний реципієнтний штам *A. oryzae* 52-3 *niaD⁻*, дефектний за нітратредуктазою, для відбору трансформантів по здатності рости на мінімальному середовищі з нітратом калію в якості єдиного джерела азоту. На другому етапі реципієнтний штам котрансформували плазмідом рАму-Аму, що несе ген гомологічної амілази під амілазним промотором, з плазмідом рSTA10, що несеселективний маркер – ген нітратредуктази. В результаті наступної селекції було отримано трансформант з рівнем активності на 20 – 30% вище вихідного штаму[33].

3.3. Схема отримання продуцента

Потенціал природньої мінливості грибів є досить великим і ще не достатньо вивчений. Тому для відбору продуцентів найдешевшим, найвигіднішим і найменш трудоемким способом є використання штучного добору в комбінації з мутагенезом (дія ультрафіолету). Тож, з метою отримання високопродуктивного штаму *Aspergillus oryzae* M можна запропонувати за такою схемою(рис. 3.1):



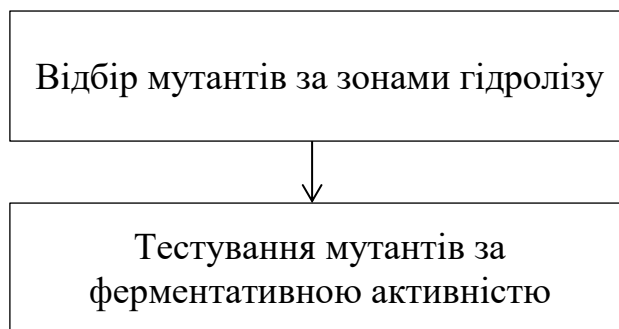


Рисунок 3.1 Схема отримання продуценту

Музейна культура зберігається на агаризованому середовищі, що містить солодове сусло 8°Б, водопровідну воду та агар – агар 3%. рН середовища 5,0-5,5. Інкубація штамів для спороношення проводять на протязі п’яти діб за температури 30°С.

Кінцеве культивування продуцента для тестування за ферментативною активністю проводять в колбах Ерленмейєра об’ємом 750 см³ з 50 см³ ферментаційного середовища глибинним способом на синтетичних і натуральних середовищах. Склад компонентів і їх кількість залежить від умов експерименту. Культивування проводять із використанням мікробіологічної качалки зі швидкістю 260 об/хв на протязі 42 – 72 годин за температури 30-36°С[34].

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва

Кінцевий продукт являє собою тонкоподрібнений порошок бежевого чи світло-сірого кольору вологістю не більше 13%, добре розчинний у воді без стороннього запаху та смаку.

Технічні умови виробництва придатні для сертифікації продукції за вимогами Державної системи сертифікації УкрСЕПРО за ДСТУ 3413-96[49].

Таблиця 4.1. Фізико-хімічні показники препарату Амілоризин[36]

Найменування показника	Значення			
	Групи			Метод аналізу
	1	2	3	
Зовнішній вигляд	Дрібнозернистий продукт			за ГОСТ 20264.1
Колір	Світло – сірий чи бежевий			за ГОСТ 20264.1
Розмір частинок, мм, не більш ніж	5	5	5	за ГОСТ 20264.1
Масова доля вологи, %, не більш ніж	13	13	13	за ГОСТ 20264.1
Амілолітична активність (АС), од/г	250±25	200±20	150±15	за ГОСТ Р 54330
Оцукрююча активність (ОС), од/г, не менш ніж	800	700	600	за ГОСТ Р 54330
Протеолітична активність (ПС), од/г, не менш ніж	2,3	2,3	2,3	за ГОСТ 20264.2
Прозорість водної витяжки	Витяжка не повинна бути мутною, допускається опалесценція			за ГОСТ 20264.1

Препарат стандартизується за амілолітичною активністю, якістю очищення і відсутністю спор гриба – продуцента і інших грибів.

За фізико – хімічними показниками препарат повинен відповідати

					ДП 6202. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Вершиніна К. Ю.			РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА			
Консульт.								
Керівник		Литвина Г. С.			КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ			
Затвер.								
					Стадія	Аркуш	Аркушів	
					Д	33	85	

вимогам, вказаним у таблиці 4.1.

Продукт призначений для покращення оцукрювання при переробці підвищеної кількості несолодженої сировини, для гідролізу білків до пептидів і амінокислот, що позитивно впливає на зброджуваність суслу дріжджами, а також для дооцукрювання сусла при фільтруванні у киплячому стані[35]. Також може використовуватись у якості харчової добавки до корму свійських тварин задля розширення і спрощення їх раціону.

Пакування. Фасування у пакети Zip-lock місткістю 1 кг за допомогою автоматичної машини для фасовки в дой-пак з zip-lock, модель 083.73.02[37].

Маркування. На упаковці вказують:

- «Україна»;
- назву підприємства, його товарний знак та адресу;
- назву препарату українською (російською) мовою та англійською (міжнародною);
- біохімічні параметри (активність, рН, температура)
- заходи безпеки
- термін зберігання
- номер серії та термін придатності;
- умови зберігання;
- маса нетто

Транспортне маркування здійснюється за ГОСТ 141-92 з нанесенням маніпуляційного знаку “Оберігати від вологи!” і наступних позначень:

- товарний знак, назва підприємства-виробника, його адреса і місце виготовлення;
- назва продукту;
- дата виготовлення;
- номер партії (серії);
- умови зберігання;
- термін придатності до споживання;

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		34

- кількість пакувальних одиниць
- ферментативна активність;
- маса нетто кожної пакувальної одиниці в г або кг;
- позначення технічних умов.

Транспортування відбувається згідно з ГОСТ Р 57249-2016 у закритих транспортних засобах згідно до санітарних вимог і правил, що діють для даного виду транспорту.

Зберігання відбувається згідно з ГОСТ Р 57249-2016 препарат зберігають у сухих чистих і добре вентильованих, захищених від прямих сонячних променів складських приміщеннях при температурі від +2°C до +15. Термін придатності до споживання – 12 місяців від дати виготовлення[38].

4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів наведена в таблиці 4.2 даного розділу згідно з даними загальноприйнятих державних діючих документів.

Таблиця 4.2. Характеристика сировини та матеріалів

Найменування	Категорія та номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина			
1.1. Вода знесолена	ФС 24-2619-99	Усі показники згідно НТД	Для приготування поживного середовища

			(ПС)
1.2. Мальтоза	ГОСТ Р 55316-2012	Усі показники згідно НТД	Компонент ПС
1.3. Крохмаль	ГОСТ Р 53876-2010	Усі показники згідно з НТД	Компонент ПС
1.5. Амонію нітрат (NH_4NO_3)	ГОСТ 2-2013	Усі показники згідно з ГОСТ	Компонент ПС
1.6. Калій фосфорнокислий однозаміщений (KH_2PO_4)	ГОСТ 4198-75	Усі показники згідно з ГОСТ	Компонент ПС
1.7. Магній сульфат (MgSO_4)	ГОСТ 4523-77	Усі показники згідно з ГОСТ	Компонент ПС
1.8. Хлорид калія (KCl)	ГОСТ 4568-95	Усі показники згідно з ГОСТ	Компонент ПС
1.9 Сульфат заліза (FeSO_4)	ГОСТ 6981-94	Усі показники згідно з ГОСТ	Компонент ПС
1.10 Пептон	ГОСТ 13805-76	Колір, запах, рН, наявність солей важких металів, індолу, волога, загальний азот	Компонент ПС

1.11 Агар мікробіологічний	ГОСТ 17206-96	рН, вміст золи, вміст загального азоту	
2. Допоміжна сировина			
2.1 Вода водопровідна	ДСТУ 7525:2014	Кольоровість, каламутність, смак, запах, рН, жорсткість, вміст мікроорганізмів і бактерій згідно з ДержСанПін	Для мийки обладнання та приміщень, приготування оди питної
2.2 Вода знесолена	ФС 42-2619-89	Згідно з Фармакопейною статтею	Для мийки тари та обладнання
2.3 Вода дистильована	ГОСТ 6709	Усі показники згідно ГОСТ	Для перевірки амілолітичної активності
2.4. Натр їдкий технічний (NaOH)	ГОСТ 2263-79	Масова частка основної речовини н/м 46%	Для визначення кислотності, нейтралізації стічних вод та мийки обладнання, екстракції
2.5. Кислота соляна (HCl)	ГОСТ 14267-77	Усі показники згідно з ГОСТ	Для регулювання кислотності
2.6. Спирт етиловий (C ₂ H ₅ OH)	ГОСТ 5962-97	Масова частка спирту, 70%	Розчин для дезінфекції

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		37

2.7. Пероксид водню (H ₂ O ₂)	ГОСТ-177	Масова частка перекису водню – 6%	Розчин для дезінфекції
2.8. Засіб миючий синтетичний і порошкоподібний	ГОСТ 25644-98	Усі показники згідно з ГОСТ	Для мийки обладнання
2.9 Стериліум	Реєстраційне посвідчення № UA/5846/01/01 Наказ МОЗУ №44 від 30.01.07	Зовнішній вигляд, маркування, термін придатності, цілісність пакування, паспорт постачальника, наявність санітарно-гігієнічного контролю	Для санітарної обробки рук
2.10 Натрій фосфорнокислий двозаміщений 12-водний	ГОСТ 4172	Молярна концентрація 1/15 моль/дм ³	Для перевірки амілолітичної активності
2.11 Калій фосфорнокислий однозаміщений	ГОСТ 4198	Молярна концентрація 1/15 моль/дм ³	Для перевірки амілолітичної активності
2.12 Йод (I ₂)	ГОСТ 4159	Усі показники згідно з ГОСТ	Для перевірки амілолітичної активності
2.13 Калій йодистий (KI)	ГОСТ 4232	Усі показники згідно з ГОСТ	Для перевірки амілолітичної активності
3. Матеріали			

3.1. Zip-lock пакети	ГОСТ 12302-83	Зовнішній вигляд, основні розміри	Пакування ферментного препарату
3.2 Стрічка з плівки ПВХ	ГОСТ 24944-81	Зовнішній вигляд, основні розміри	
3.3. Коробка картонна	ОСТ 64-071-89	Зовнішній вигляд, основні розміри	Пакування по 30 пакетів
3.4. Папір етикеточний	ГОСТ 7625-86	Зовнішній вигляд, 70 г/м ²	
3.5. Стрічка клеєва на паперовій основі	ГОСТ 18251-87	Розмір бабіни, маркування	
3.6. Фарба штемпельна	ТУ 6-15-459-90	Зовнішній вигляд, час висихання не більше 10 с	
3.7. Паперові пакети для одягу (папір технічний)	ГОСТ 1760-86	Зовнішній вигляд	
3.8. Марля медична	ГОСТ 9412-93	Зовнішній вигляд маркування	
3.9. Тканини бавовнопаперові та змішані побутові	ГОСТ 29298-92	Зовнішній вигляд маркування	

4.Напівфабрикати			
4.1. Посівний матеріал	Згідно з виробничим регламентом	Мікробіологічна чистота	Для засіву посівного апарату

4.3.Опис технологічного процесу

Нижче наведено опис технологічного процесу промислового виробництва альфа-амілази згідно з даними літератури[26,29,34,35,39].

ДР1. Санітарна підготовка виробництва

ДР1.1 Санітарна підготовка персоналу.

Даний етап включає в себе навчання і періодичну перевірку знань персоналу, а також забезпечення його санітарного і гігієнічного стану.

ДР1.1.1 Навчання персоналу і періодична перевірка знань.

Кожен працівник перед початком роботи проходить навчання, інструктаж з техніки безпеки, зокрема з пожежної безпеки, з охорони праці. Також періодично проводиться перепідготовка робітників вже безпосередньо в процесі роботи на підприємстві.

Працівники зобов'язані виконувати наступні вимоги:

1. Кожен член робочого персоналу повинен проходити попереднє та періодичне медичне та бактеріологічне обстеження;
2. Кожен працівник зобов'язаний дотримуватись правил особистої гігієни, а саме мити голову мінімум 1 – 2 рази на тиждень, не носити бороду, або, в якості виключення надягати на неї спеціальну захисну шапочку;
3. Робітники зобов'язані працювати лише в спеціальному, регламентованому для цього, технологічному одязі;
4. Працівники зобов'язані повідомляти роботодавця про кожне захворювання(порізи, наріви, шкіряні, застудні захворювання). В санітарному журналі щоразу повинен робитись відповідний запис;

5. На виробництві заборонено носіння ювелірних виробів та інших прикрас, ручих годинників, а також заборонено користуватися косметикою;
6. Заборонено піднімати і продовжувати використання предметів, що впали на підлогу, в процесі роботи, не обробивши їх попередньо належним чином;
7. Якщо при профілактичному огляді у працівників виявлено грибкові або гнійничкові захворювання шкіри, заборонено допускати таких працівників до роботи;
8. Вхід та вихід у межах чистих приміщень суворо обмежений.

Працівники чистих приміщень обов'язково повинні бути ознайомлені з правилами поведінки у приміщеннях відповідного класу чистоти.

Інструктаж повинен проводитися не рідше одного разу на рік, запис про кожен інструктаж обов'язково повинен бути наявним у відповідному журналі. Обов'язково проводиться перевірка знань. Працівники, що не пройшли навчання, не можуть знаходитись у виробничих зонах.

ДР 1.1.2 Забезпечення належного санітарного стану персоналу

Згідно з законом України про охорону праці, працівники зобов'язані раз на рік проходити медичне обстеження на підприємстві. При виявленні ухилень від норми працівники до роботи не допускаються. Працювати можна лише в спеціальному, призначеному для цього одязі.

Контроль мікробної забрудненості рук проводять один раз на тиждень у кількох робітників одного цеху вибірково, та раз на два тижні після обробки рук дезінфікуючими засобами. В нормі, після обробки рук дезрозчинами, на руках повинні бути відсутні мікроорганізми.

В процесі роботи допустима наявність не більше десяти колоній неспороутворюючих мікроорганізмів на двох різних чашках Петрі.

ДР 1.2 Приготування дезінфікуючих розчинів

Даний етап включає такі стадії, як приготування розчину миючого засобу, приготування 76% розчину спирту та 6% розчину перекису водню.

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		41

Приготування здійснюється згідно з МУ-64-11-100, із дотриманням відповідних норм техніки безпеки.

Вибір засобів обумовлюється їх ефективністю, безпечністю для людини. Миючі та дезінфікуючі засоби мають бути стерильними[39].

ДР 1.2.1 Приготування розчину миючого засобу

Приготування відбувається у реакторі – змішувачі, куди через дозатор подається миючий засіб «Сульфонол» у кількості 100 см³, та доводиться до об'єму 10 дм³ водою очищеною. Далі інтенсивно перемішують.

ДР 1.2.2 Приготування розчину перексиду водню 6%

Приготування відбувається в реакторі – змішувачі, куди через дозатор подається 33% перекис водню, який розводиться до 6% концентрації необхідним об'ємом води очищеної. Термін зберігання – 5-6 діб.

ДР 1.2.3 Приготування розчину спирту 70%

Приготування відбувається у стерильному реакторі – змішувачі, куди через дозатор подають 96% етиловий спирт і розводять його водою очищеною до концентрації 70%. Спирт застосовують для санітарної обробки рук персоналу та дезінфекції вузлів обладнання.

ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень

Дана стадія включає в себе щоденне та генеральне прибирання. Проводиться згідно з МУ 42-51-4-93.

ДР 1.3.1 Щоденне прибирання

На початку і в кінці виробничого процесу приміщення миють з миючими та дезінфікуючими (розчин перексиду водню 6%) розчинами. Обробка поверхонь проводиться досить ретельно, із приділенням особливої уваги підлозі та стінам, що знаходяться у контакті з обладнанням.

Перед початком робіт, що пов'язані із відновленням музейної культури, у лабораторних приміщеннях необхідно провести прибирання із використанням миючих і дезінфікуючих (перексид водню) засобів. Перед пересіванням музейної культури лабораторне приміщення додатково оброблюють УФ-випромінюванням.

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		42

ДР 1.3.2 Генеральне прибирання

Генеральне прибирання проводиться раз на тиждень. Стіни, двері, робочі поверхні приміщень спорскують 3% розчином перекису водню, приміщення закривають на 30-40 хвилин, після чого надлишок розчину видаляється поролоновою губкою.

У виробничих приміщеннях миють підлогу із 0,1% розчином мийного засобу у розрахунку 100 мл/м² поверхні підлоги.

Після закінчення вологого прибирання чисті приміщення звільнюють від персоналу та вмикають бактерицидні лампи на 2 години. Потім, не менш ніж за 30 хвилин до роботи вмикають проточну, а потім витяжну вентиляцію.

ДР1.4 Підготовка виробничого одягу

Даний етап включає в себе прання, ополіскування, сушіння, пакування та стерилізацію одягу. Комплект одягу є одноразовим, або використовується лише протягом однієї зміни, після чого передається на обробку згідно МУ – 64 – 11 – 10.

ДР 1.4.1 Прання одягу

Прання відбувається у пральній машинці протягом 30 хвилин за температури води 40-60°C і концентрації прального засобу 2 г/дм³.

ДР 1.4.2 Ополіскування одягу

Ополіскування проводиться очищеною водою у пральній машинці із витратою не менше ніж 20 дм³ води очищеної на 1 кілограм одягу.

ДР 1.4.3 Сушіння одягу

Сушіння проводиться у сушильній шафі повітрям класу D, за температури 70°C на протязі 30 хвилин.

ДР 1.4.4 Пакування одягу

Після закінчення сушіння комплекти по одному запаковуються у два шари паперу згідно з ГОСТ 1341-84.

ДР 1.4.5 Стерилізація одягу

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		43

Пакети з одягом стерилізуються у бокси з кришками, не ущільнюючи пакунки, і стерилізують в автоклаві перехідного типу за надлишкового тиску 0,1 МПа, температурі 120°C на протязі 1 години.

ДР 1.5 Підготовка обладнання та комунікацій

Даний пункт включає в себе мийку та ополіскування обладнання і комунікацій із подальшою їх стерилізацією. Комплекс робіт направлений на забезпечення чистоти та стерильності виробничого обладнання з метою надання належної якості продукції. На даному етапі проводиться контроль мікробіологічної контамінації.

ДР 1.5.1 Мийка обладнання та комунікацій

На даному етапі робітники повинні бути одягнені у спецодяг, гумові рукавички і марлеву пов'язку.

Мийка вузлів обладнання проводиться синтетичними мийними засобами, з подальшою обробкою дезінфекторами за температури +50-60°C. Частини обладнання, що знаходяться у контакті з препаратом, знімають і ретельно миють за температури +50-60°C.

Дезінфекція проводиться із використанням спирту етилового 70%. Зовнішні поверхні обладнання оброблюються таким же чином, як і виробничі приміщення. Для оптимізації процесу дозволяється поєднання процесу миття та дезінфекції обладнання.

ДР 1.5.2 Ополіскування

Після миття і обробки внутрішніх поверхонь і комунікацій, їх ополіскують кілька разів, використовуючи воду очищену. Те ж саме проводять і з частинами обладнання, що знімаються. Після ополіскування обов'язкове проведення контролю якості мийки.

ДР 1.5.3 Стерилізація обладнання та комунікацій

Стерилізація відбувається з використанням насиченої пари під тиском, що вводиться безпосередньо у апарат. Температура стерилізації – 140°C, тиск – 0,15МПа, тривалість – дві години. Ефективність стерилізації обов'язково перевіряється із використанням мікробіологічного контролю.

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		44

ДР 2 Підготовка стерильного повітря

Згідно GMP виділяють чотири класи чистоти для виробництва стерильної продукції, а саме А, В, С, D, у порядку зменшення їх стерильності. В даному виробництві використовується повітря класу С, D.

ДР 2.1 Підготовка вентиляційного повітря

Підготовку вентиляційного повітря здійснюють згідно з «Методичними рекомендаціями щодо підготовки вентиляційного повітря для виробничих приміщень» затверджені Наказом МОЗ України від 14 грудня 2001 р. № 502.

Для постачання виробництва вентиляційним повітрям використовують як звичайні системи турбулентної вентиляції, що забезпечують стерильність повітря в приміщенні, так і системи з ламінарним потоком повітря по всій площі приміщення чи у визначених робочих зонах.

Повітря для приміщень класу чистоти D використовують після фільтрів попереднього очищення повітря.

ДР 2.1.1 Забір повітря

Забір повітря відбувається через повітрозабірник і забірну шахту висотою 20 -30 м.

ДР 2.1.2. Попередня очистка повітря від механічних часток

Використовуються фільтри попередньої очистки з можливістю затримки ч механічних частинок більше 5 мкм. Для очистки повітря від грубого пилу використовують коміркові фільтри.

ДР2.1.3 Транспортування повітря

Відбувається за тиску 0,2 МПа.

ДР 2.1.4. Стабілізація термодинамічних показників повітря

Відбувається у ресивері, куди повітря поступає після попередньої очистки. Виходить повітря з ресиверу під тиском 0,3 МПа.

ДР 2.1.5. Стерилізація повітря

Очистка проходить на фільтрах типу HEPA з діаметром пор 1,5 мкм. Забезпечується ступінь очищення 98%. Таке повітря придатне для використання у приміщеннях класу D.

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		45

ДР 2.2. Підготовка технологічного повітря

ДР2.2.1, ДР 2.2.2, ДР 2.2.3, ДР 2.2.4 повітря проходить аналогічно ДР 2.1

ДР 2.2.5. Стерилізація повітря

Відбувається на загальному фільтрі типу НЕРА з діаметром пор 0,5 мкм та на індивідуальному фільтрі, в залежності від технологічного процесу.

ДР3. Водопідготовка

Проводиться у два етапи, які включають в себе попередню фільтрацію води та мембранну очистку.

ДР3.1 Попередня фільтрація води

Відбувається на фільтрі попередньої очистки, де вода водопровідна очищується від механічних часток.

ДР 3.2. Мембранна очистка води

Відбувається з використанням високоякісних осмотичних мембран. В даній роботі буде використовуватись установка з продуктивністю 100 дм³ /год і з використанням мембрани типу УОФ 2500.

ДР4. Приготування поживного середовища

Процес приготування поживного середовища є дуже важливим і відповідальним, адже від цього напряму залежить якість продукту, який буде отриманий.

До сировини висуваються наступні вимоги:

- доступність
- дешевизна
- стандартність складу
- стабільність
- гарна розчинність у воді
- легка засвоюваність мікроорганізмами
- здатність забезпечувати основні потреби мікроорганізмів

ДР4.1 Підготовка сольових компонентів

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		46

ДР4.1.1 Дозування та змішування компонентів середовища

Дозування NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , KCl , FeSO_4 відбувається із використанням технічних терезів, після чого сіль вручну засипається у реактор – змішувач, куди додається знесолена вода. Процес відбувається протягом 10 хвилин за температури 60°C .

ДР4.1.2 Стерилізація розчину

Реактор – змішувач, в якому проводиться приготування розчину солей, оснащений сорочкою, де у процесі стерилізації циркулює вода температурою до 110°C , за тиску $0,2\text{МПа}$. Стерилізація проходить на протязі 55 хвилин. Після завершення процесу розчин під тиском передавлюється до посівного апарату чи ферментеру, попередньо пройшовши через тканинний фільтр для відділення компонентів, що не розчинилися.

ДР4.2 Підготовка джерел вуглеводів

ДР4.2.1 Приготування розчину крохмалю з мальтозою

На технічних вагах зважують необхідну кількість мальтози і крохмалю, вручну переносять їх до реактора – змішувача, куди додається певна кількість води. Перемішують до повного розчинення крохмалю.

ДР4.2.2 Стерилізація розчину

У сорочку ректора – змішувача поступає теплоносієм температурою до 150°C . Стерилізація відбувається протягом 30 хвилин. Після завершення процесу розчин під тиском передавлюється до посівного апарату чи ферментеру, попередньо пройшовши через тканинний фільтр для відділення компонентів, що не розчинилися.

ТП5. Отримання посівного матеріалу

Для нормального росту, розвитку і розмноження культури продуцента необхідне середовище, яке забезпечить її всіма необхідними поживними речовинами.

ТП 5.1. Відновлення музейної культури

Для відновлення музейної культури використовується середовище Сабуро з мальтозою. Стерильно засіяні чашки Петрі інкубуються у

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
						47
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

термостаті із температурою 30°C на протязі 5 діб. Здійснюється мікробіологічний контроль.

ТП5.2 Вирощування культури в колбах

Культуру стерильно переносять в колби з рідким середовищем і інкубують за температури 30°C на протязі 5 діб, використовуючи качалки для постійного перемішування.

ТП6. Культивування в посівному апараті

ТП6.1 Змішування компонентів поживного середовища

В посівному апараті відбувається остаточне перемішування компонентів поживного середовища до їх повної гомогенізації.

ТП6.2 Внесення посівного матеріалу та вирощування

Культуру з колби переносять у промисловий посівний апарат ємністю 6,3 м³, подають середовище і інкубують при температурі 30 °C, рН 3,5 -4.0 протягом 30 год. Усі процеси пов'язані з накопиченням біомаси проводять в асептичних умовах.

Культура продуцента є аеробною, розвивається в глибинних умовах і потребує розчиненого кисню, який подається у середовище за допомогою барботера.

ТП7. Виробниче культивування

Приготоване стерильне поживне середовище засівають посівним матеріалом у кількості 10% від об'єму середовища.

Оптимальні умови росту *Aspergillus ouzae* визначають наступний режим ферментації:

- температура 30°C;
- аерація 1м³/(м³хв);
- надлишковий тиск в апараті 0,3 МПа фіксується по манометру;
- постійне перемішування – 120 об/хв.
- рН в процесі ферментації 3,5 – 4.0.

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		48

Для проведення мікобіологічного та біохімічного контролю беруть проби середовища після засіву та наприкінці культивування. В цих пробах визначають:

- концентрацію біомаси (г/дм³);
- концентрацію білка (г/дм³) (метод Лоурі);
- концентрацію редуруючих цукрів (г/дм³) (метод Бертрана)
- оцінка фізіологічного стану культури;
- наявність сторонньої мікрофлори (мікроскопіювання);
- полісахариди (фенол-сірчаноокислий метод);
- амілолітична активність.

Тривалість процесу культивування 5 діб.

ТП8. Відділення біомаси

У даному випадку буде використовуватися камерний фільтр – прес з автоматичним відвантаженням осаду. Робочий тиск такого фільтр – пресу становить до 1,9МПа, має 6 пакетів відвантаження і дозволяє збір осаду до 50 мм. Дозволяє отримати продукт з масовою часткою вологи 60 - 70%

ТП9. Ліофільна сушка біомаси

Процес сушки проходить в апараті ВС-150 КПИ. Висушування проходить при температурі повітря, нагрітого в паровому калорифері до 120-130 °С

ТП10. Сепарація культуральної рідини

Сепарація культуральної рідини відбувається у промисловому сепараторі із функцією саморозвантаження фірми «Вестфалія Сепаратор» з продуктивністю 2000-4000 л/год, на протязі 40 хвилин.

ТП11. Центрифугування культуральної рідини

Центрифугування відбувається на промисловій центрифугі продуктивністю 970 об/хв.

ТП12. Випарювання культуральної рідини

Випарювання відбувається на промисловій вакуум - випарній установці типу Віганд – 2000 з продуктивністю 2000 кг/год, тиском 0,025МПа і

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		49

кінцевим вмістом води до 40%. Випарювання проводиться протягом 40 хвилин.

ТП13. Осадження препарату етанолом[47]

Цей етап відбувається в установці безперервного осадження, куди з теплообмінника для охолодження подається спирт.

ТП14. Центрифугування препарату

Центрифугування відбувається на промисловій центрифугі продуктивністю 970 об/хв.

ТП15. Висушування препарату

Висушування відбувається на промисловій вакуум – сушарці типу RTSD 1500 з продуктивністю 1000 об/хв.

ТП16. Контроль якості готової продукції

Якість даної продукції здійснюється згідно з ГОСТ 20264.1-89. Основні параметри, які контролюються, це:

- зовнішній вигляд
- вологість
- відсутність спор грибів
- амілолітична активність

ПМВ17. Пакування, маркування, відвантаження готової продукції

ПМВ17.1 Фасування готової продукції

Ферментний препарат фасується у Zip-lock пакети номіналом 1 кг за допомогою автоматичної машини для фасування у дой – пак з зіп – лок 083.73.02. Швидкість пакування – 30-35 пакетів/хв.

ПМВ17.2. Маркування і пакування продукції

На цій же автоматичній машині на пакет наноситься наліпка із назвою і всією необхідною інформацією. Далі пакети запаковують у групові картонні коробки по 30 шт/коробка.

ЗВ18. Знешкодження та знезараження відходів

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
						50
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

В процесі виробництва майже на кожному етапі утворюється певна кількість відходів, яку необхідно знешкодити перед утилізацією.

ЗВ18.1 Знешкодження рідких відходів

Залишки мийних та дезінфікуючих засобів після санобробки виробництва, промивні води після ополіскування обладнання та промивні води після миття посівного апарата та ферментера збирають у збірник нейтралізації стічних вод, розбавляють водою водопровідною у 3-4 рази, доводять рН до 7,0 розчином натра їдкого або HCl і зливають в загальнозаводську каналізацію.

ЗВ18.2 Знешкодження некондиційного матеріалу

Некондиційний матеріал з посівного апарату чи з ферментера піддають термічній обробці у тих же самих апаратах гострою парою під тиском 0,3МПа, температурі 130-132°C на протязі 45 хвилин, потім охолоджують, доводять рН до 7,0 тими ж реактивами, що використовувалися для знешкодження рідких відходів, і зливають у загальнозаводську каналізацію.

ЗВ18.3 Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи, зокрема, склобій, рукавички, пакувальні матеріали, одноразові технічні костюми, браковані пакети утилізуються на міському сміттєзвалищі.

ПВ19. Переробка матеріалів

ПВ19.1 Відновлення тканинних фільтрів

Тканинні фільтри вимочуються у гарячій воді, з подальшим їх очищенням та обробкою дезрозчинами.

ПВ19.2 Відновлення мембранних фільтрів

Мембранні фільтри відновлюються у кілька етапів:

- лужна промивка (рН 11,5-12,0)
- кислотна промивка (рН 2,5 – 3,0)
- дезінфекція

4.4 Матеріальний баланс виробництва

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		51

Матеріальний баланс розраховано на 1 цикл виробництва, що триває 6,5 діб без урахування часу, необхідного на відновлення музейної культури. (Табл. 4.3).

Баланс складено для культивування культури в посівному апараті (розраховано на 0,240 м³, адже об'єм посівного апарату 0,4 м³, з урахуванням коефіцієнта заповнення 0,6) та для синтезу у ферментері (об'єм 6,3 м³, з урахуванням коефіцієнту заповнення 0,6).

Таблиця 4.3 Матеріальний баланс виробництва альфа-амілази

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів, напівпродуктів	Кількість			Назва сировини, матеріалів, напівпродуктів	Кількість		
	Кг	шт	Л		кг	шт	Л
1	2	3	4	5	6	7	8
ТП5. Отримання посівного матеріалу							
Мікологічний пептон	0,1			Посівний матеріал			8,5
Мальтоза	0,4						
Агар - агар	0,15						
Вода очищена			10	Втрати			1,5
Всього			10	Всього			10
ТП6. Культивування в посівному апараті							
Посівний матеріал			8,5	Культуральна рідина			184,8
NH ₄ NO ₃	1,2			Міцеліальна біомаса	31,2		
KH ₂ PO ₄	0,24						
MgSO ₄	0,12						
KCl	0,12						
FeSO ₄	0,0024						
Мальтоза	2,4						
Крохмаль	2,4						
Вода очищена			240	Втрати			24

Всього			248,5	Всього			248,5
ТП7. Виробниче культивування							
Культура з посівного апарату			240	Культуральна рідина з біомасою			3402
Поживне середовище			3540	Втрати			378
Всього			3780	Всього			3780
ТП8. Відділення біомаси у камерному фільтр-пресі							
Культуральна рідина з біомасою			3402	Культуральна рідина			2214,702
				Біомаса	949,158		
				Втрати			238,14
Всього			3402	Всього			3402
ТП9. Ліофільна сушка біомаси							
Волога біомаса	949,58			Суха біомаса	369,83		
				Втрати вологи			569,748
				Втрати	10,002		
Всього	949,58			Всього	949,58		
ТП10. Сепарація культуральної рідини							
Культуральна рідина			2214,702	Культуральна рідина			1921,39
				Відходи	287,911		
				Втрати			5,4
Всього			2214,702	Всього			2214,702
ТП11. Центрифугування культуральної рідини							
Культуральна рідина			1921,39	Культуральна рідина			1719,11
				Осад			197,28
				Втрати			5

Всього			1921,39	Всього			1921,39
ТП12. Випарювання культуральної рідини							
Культуральна рідина			1719,11	Культуральна рідина			686,644
				Втрати по волозі			1031,47
				Втрати			1
Всього			1719,11	Всього			1719,11
ТП13.Осадження препарату етанолом							
Культуральна рідина			1719,11	Осад	1020,466		
Етанол 70%			400	Надосадова рідина зі спиртом			1087,745
				Втрати			11
Всього			2119,11	Всього			2119,11
ТП14.Центрифугування препарату							
Осад	1020,466			Осад біомаси	867,4		
				Втрати	152,6039		
Всього	1020,466			Всього	1020,466		
ТП15. Висушування препарату							
Осад біомаси	867,4			Сухий препарат	277,568		
				Втрати по волозі			589,832

Всього	867,4			Всього	867,4		
ТП16. Контроль якості							
Ферментний препарат	277,568			Ферментний препарат	269		
				Втрати	8,568		
Всього	277,568			Всього	277,568		
ПМВ17. Пакування, маркування відвантаження							
Ферментний препарат	269			Запакований сухий препарат	1	269	
Zip-lock пакети		269					
Групові коробки		9					
Всього			547	Всього			547

4.5 Контроль виробництва

Контроль виробництва здійснюється майже на кожному етапі з метою отримання якісної продукції, яка відповідає всім нормам, зазначеним у відповідних нормативних документах.

Показники, які контролюються на кожному етапі, методи контролю та норми наведені у таблиці 4.4

Таблиця 4.4 Контроль виробництва

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5

ДР 1.2.1 Приготування розчину миючого засобу К _т 1 К _х 2	Концентрація розчину	Мірний посуд, візуально	Кожну операцію	Норма відхилення 5%
ДР 1.2.2 Приготування розчину пероксиду водню 6% К _т 3, К _х 4	Концентрація розчину	Кількісний хімічний аналіз	Кожну операцію	Норма відхилення 2%
ДР 1.2.3 Приготування розчину спирту 70% К _т 5 К _х 6	Концентрація розчину	Кількісний хімічний аналіз	Кожну операцію	Норма відхилення 2%
ДР 1.3.1 Щоденне прибирання К _м 7	Приміщення, запиленість	Візуально	Кожну операцію	
ДР 1.3.2 Генеральне прибирання К _м 8 К _м 9.	Приміщення, запиленість, вміст мікроорганізмів в повітрі	Візуально та мікробіологічний аналіз	Кожну операцію	
ДР 1.4.1 Прання одягу К _т 10	Якість прання	Візуально	Кожну операцію	
ДР 1.4.2 Ополіскування одягу К _т 11	Якість ополіскування	Візуально	Кожну операцію	
ДР 1.4.3 Сушіння одягу К _т 12	Якість сушки	Візуально	Кожну операцію	
ДР 1.4.4 Пакування одягу К _т 13	Якість пакування	Візуально	Кожну операцію	

ДР 1.4.5 Стерилізація одягу К _т 14 К _м 15	Якість стерилізації	Візуально та мікробіологічн ий аналіз	Кожну операцію	
ДР 1.5.1 Мийка обладнання та комунікацій К _т 16	Чистота обладнання	Візуально	Кожну операцію	
ДР 1.5.2 Ополіскування К _т 17	Якість ополіскування	Візуально	Кожну операцію	
ДР 1.5.3 Стерилізація обладнання і комунікацій К _т 18 К _м 19	Чистота обладнання і вміст мікроорганізмів	Візуально та мікробіологічн ий аналіз	Кожну операцію	
ДР 2.1 Підготовка вентиляційного повітря К _т 20 К _м 21	Мікробіологічн а чистота, вміст часток, вологість	Мікробіологічн ий метод, висів на чашки Петрі. Психометр технічний	Кожні 24 години Кожні 48 години	В 1м ³ повітря 100 колоній. Число часток в 1м ³ повітря 350 тис. (d=0,5 мкм), 2 тис. (d=5 мкм). W=60% Стерильніс ть 98%
ДР 2.2 Підготовка технологічного повітря К _т 22 К _м 23	Мікробіологічн а чистота, вміст часток, вологість	Мікробіологічн ий метод, висів на чашки Петрі. Психометр технічний	Кожні 24 години Кожні 48 години	В 1м ³ повітря 100 колоній. Число часток в 1м ³ повітря 350 тис.

				(d=0,5 мкм), 2 тис. (d=5 мкм). W=60% Стерильність 99%
ДР 3. Водопідготовка K _T 24 K _X 25 K _M 26	Вміст домішок та якість води	Кількісний хімічний аналіз	Кожну операцію	
ДР 4.1 Підготовка Сольових компонентів поживного середовища K _T 27 K _X 28 K _M 29	Температура, тиск, час, стерильність	Автоматичний регулятор температури, манометр технічний, годинник, висів на чашки Петрі	Кожну операцію	110°C, 0,2 МПа, 55 хв., стерильне
ДР 4.2 Підготовка джерел вуглеводів K _T 30 K _X 31 K _M 32	Температура, тиск, час, стерильність	Автоматичний регулятор температури, манометр технічний, годинник, висів на чашки Петрі	Кожну операцію	150°C, 30 хв., стерильне
ТП 5. Отримання посівного матеріалу K _T 33 K _X 34 K _M 35	Культуральна рідина рН, температура, тиск, контамінація чужорідною мікрофлорою, концентрація біомаси	За рН-метром, термометр, манометр, мікроскопіювання, висів на чашки Петрі, ваговим методом	Кожні 8 годин Кожні 4 години	30°C Відсутність контамінації
ТП 6. Культивування в посівному апараті K _T 36 K _X 37	Температура, тиск рН, тривалість, наявність чужорідної мікрофлори	За рН-метром, термометр, манометр, годинник, мікробіологічний метод	Кожні 8 годин Кожні 4 години	30 год 30°C 0,3 МПа рН=3,5-4,0 Відсутність

К _м 38				контамінація
ТП 7. Виробниче культивування К _т 39 К _м 40 К _х 41	Режим культивування, температура, рН, тривалість, наявність чужорідної мікрофлори	Термометр, рН – метр, годинник, мікробіологічн ий метод	Кожну операцію	30°C, 5 діб, рН=3,5-6,5 Відсутніст ь контаміна ції
ТП 8. Відділення біомаси на камерному фільтр - пресі К _т 42 К _м 43	Тиск, час, контамінація, вологість	Манометр, візуально	Кожну операцію	0,8-1,9 МПа w=60-70% Відсутніст ь контаміна ції
ТП 9. Ліофільна сушка біомаси К _т 44 К _м 45	Температура, мікробна контамінація	Термометр, мікробіологічн ий метод	Кожну операцію	120-130 °C, відсутність контаміна ції
ТП 10. Сепарація культуральної рідини К _т 46 К _м 47	Час, мікробна контамінація	Годинник, мікробіологічн ий метод	Кожну операцію	40 хв відсутність контаміна ції
ТП 11. Випарювання культуральної рідини К _т 48 К _м 49	Час, тиск, рівень вологості, мікробна контамінація	Годинник, манометр, мікробіологічн ий метод	Кожну операцію	40 хв 0,0025МП а w=40%, відсутність контаміна ції
ТП 12. Висушування культуральної рідини у розпилювальні й сушарці К _т 50 К _м 52	Температура, рівень вологості, мікробна контамінація	Годинник, мікробіологічні методи	Кожну операцію	120 °C w=8-10%, відсутність контаміна ції

ТП13 Осадження біомаси етанолом K _x 53 K _m 54	Концентрація етанолу, мікробна контамінація	Методи за ГОСТ 3639-79, мікробіологічні методи	Кожну операцію	70% відсутність контаміна ції
ТП14 Центрифугуван ня препарату K _T 55 K _m 56	Час, мікробна контамінація	Годинник, мікробіологічні методи	Кожну операцію	40 хв, відсутність контаміна ції
ТП15 Висушування препарату у барабанній вакуум – сушарці K _T 57 K _m 58	Час, мікробна контамінація	Годинник, мікробіологічні методи	Кожну операцію	20 хв, відсутність контаміна ції
ТП16. Контроль якості готової продукції K _T 59, K _m 60	Норми, згідно з ГОСТ 20264.1- 89	Кількісний хімічний аналіз та мікробіологічн ий	Кожну операцію	
ПМВ 17. Пакування, маркування, відвантаження K _T 61	Маса, кількість пакетів у коробці, цілісність	Автоматично	Кожну операцію	
ЗВ 18. Знешкодження відходів K _x 62 K _m 63	Концентрація відходів	Кількісний хімічний аналіз та мікробіологічн ий	Кожну операцію	
ПВ 19. Переробка матеріалів K _T 64 K _m 65 K _x 66	Концентрація	Кількісний хімічний аналіз	Кожну операцію	

На виробництві також контролюється якість готової продукції, в процесах якої неякісна, або некондиційна продукція передається на знешкодження, перевіряється якість пакування і маркування, як індивідуального, так і групового.

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
						61
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Вибір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Необхідною умовою, яка обов'язково має виконуватись і враховуватись у процесі біосинтезу є забезпечення обов'язкової гомогенізації і перемішування поживного середовища. Розрізняють два види ферментерів, які здатні задовольнити дану вимогу. Це:

- ферментери з пневматичним перемішуючим пристроєм;
- ферментери з механічним перемішуючим пристроєм.

Оскільки ферментери з пневматичним перемішуючим пристроєм пристосовані в основному для ферментерів невеликого об'єму, та переважно в тому випадку, коли культура не потребує інтенсивного перемішування, більш доцільним є використання ферментеру з механічним перемішуючим пристроєм.

Апарати з механічним перемішуючим пристроєм є найбільш розповсюдженими у біотехнологічній промисловості сьогодення. Вони мають мішалку, що складається з лопатей різної форми і валу. Мішалка – рухомий робочий орган механічного перемішуючого пристрою, який здійснює безпосередню дію на рідке середовище. Перспективи застосування даного виду апаратів пов'язані з високою швидкістю масообміну кисню і великою економією потужності[40].

Вибір типу ферментера залежить від характеристики сировини, яку переробляють, параметрів технологічного режиму і визначається техніко економічними міркуваннями.

					ДП 6202. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив	Вершиніна К.Ю.				РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	62
						Аркушів	
						85	
Керівник	Литвина Г.С.					КПІ ім. Ігоря Сікорського	
Затвер.						ФБТ	

На рисунку 5.1 наведено конструкцію ферментера з турбінною мішалкою, який включає в себе привід та вал, який передає обертання від приводу до мішалки.

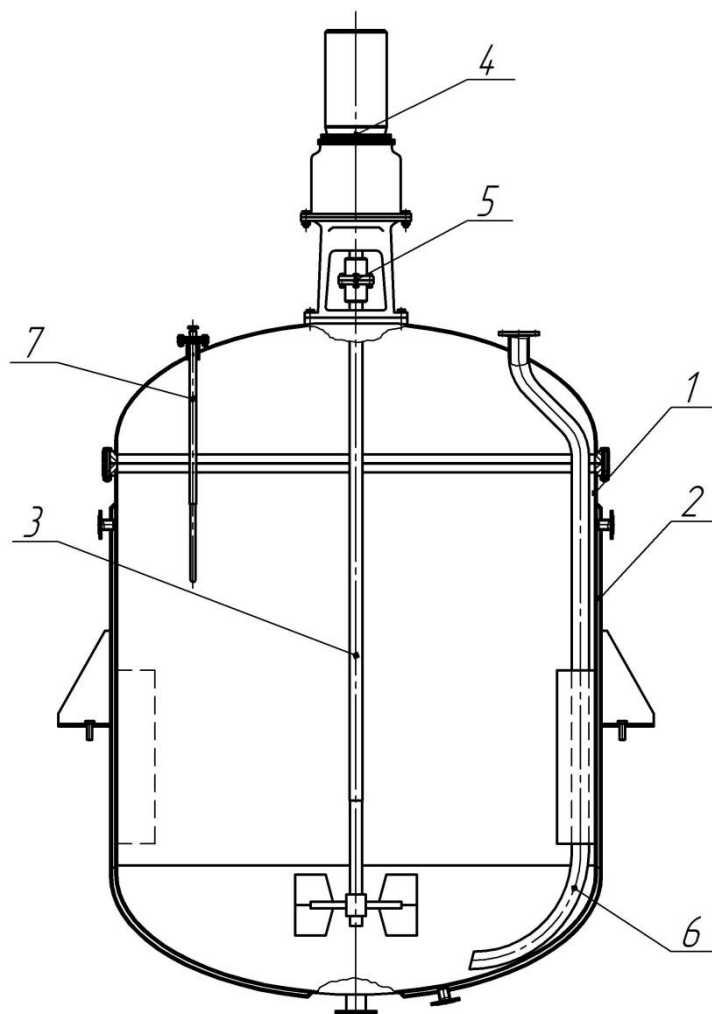


Рис.

Рисунок 5.1 Реактор з турбінною мішалкою [41]

Реактор складається з таких елементів, як посудина 1, теплообмінна сорочка 2, перемішуючого пристрою 3, привід перемішуючого пристрою 4. Вал перемішуючого пристрою і вал приводу з'єднуються між собою муфтою 5. також у апараті встановлено трубу передавлювання 6, гільзу термометра 7, пристрої для вимірювання рівня рідини, тощо.

Перемішування в реакторі здійснюється за рахунок багаторазового руху елементів об'єму рідини, що викликаний обертанням мішалки. Мішалки бувають різних типів. Основними є лопатеві, якірні, рамні, турбінні та пропелерні.

- Лопатева мішалка. Використовується для перемішування взаєморозчинних рідин, грубого емульгування, переведення твердих частинок в завислий стан у рідині при їх концентрації до 90%. Є простими у конструкції, але є не дуже інтенсивними. Основні переваги – низька вартість і простота.
- Пропелерна мішалка. Використовується для розчинення, емульгування рідин, переведення твердих частинок в завислий стан при їх концентрації до 50%. Є ефективними тоді, коли необхідно створити сильну циркуляцію рідин при невеликих затратах енергії.
- Турбінна мішалка. Використовується для розчинення, емульгування рідин, переведення твердих частинок в завислий стан при їх концентрації до 80%.
- Якірна мішалка. Використовується для перемішування в'язких та важких рідин, інтенсифікація теплообміну, попередження випадання осаду на стінках і днищі, переведення в завислий стан твердих частинок у в'язких середовищах;
- Рамна мішалка. Використовується з тією ж метою що і якірна, а також для перемішування в'язких рідин у великих об'ємах [41].

Таким чином, для процесу біосинтезу, де необхідне постійне інтенсивне перемішування і середовище володіє певною в'язкістю, доцільним є використання турбінної мішалки. Мішалка складається з однієї або кількох турбін, укріплених на одному валу.

У процесі біосинтезу відбувається виділення тепла, тому для забезпечення ефективності процесу необхідна наявність сорочки. На кришці апарату передбачено кілька штуцерів, а саме для подання посівного матеріалу, поживного середовища, технічний люк. Передбачено наявність технологічного штуцера для введення миючих засобів. Зливний штуцер розташовано знизу. Також в корпусі апарату розміщено барботер.

Технічна характеристика ферментера

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		64

Розрахований ферментер призначений для процесу біосинтезу альфа-амілази із використанням *Aspergillus oryzae* в якості продуцента.

1. Номінальний об'єм – $6,3 \text{ м}^3$
2. Коефіцієнт заповнення – 0,6
3. Робочий об'єм – $3,78 \text{ м}^3$
4. Площа поверхні теплообміну – $8,782 \text{ м}^2$
5. Температура середовища:
 - культурального (в ферментері) – 30°C
 - в рубашці (середня температура охолоджуючого агента) – 23°C
6. Тип перемішуючого пристрою – турбінна мішалка
7. Частота обертання мішалки – 2 с^{-1}
8. Потужність електродвигуна – 22 кВт
9. Тип електродвигуна – АИР100S2
10. Розміри:
 - внутрішній діаметр корпусу – 1,8 м
 - ширина – 2,165 м
 - висота – 5,2 м

5.2 Технологічний, конструктивний, тепловий розрахунки ферментера

5.2.1 Технологічний розрахунок

Розрахуємо ферментер для виробництва альфа-амілази, продуцент *Aspergillus oryzae*. Об'єм апарату – $6,3 \text{ м}^3$, коефіцієнт заповнення – $K_3 = 0,6$. Температура в апараті підтримується на рівні $t_k = 30^\circ\text{C}$. Температура охолоджуючого агента (води): на вході – $t_1 = 20^\circ\text{C}$, на виході – $t_2 = 27^\circ\text{C}$.

Розрахунок основних розмірів ферментеру

Номінальний об'єм: $V_H = 6,3 \text{ м}^3$

Коефіцієнт заповнення, $K_3 = 0,6$

Робочий об'єм: $V_p = V_H \cdot K_3$

$V_p = 6,3 \cdot 0,6 = 3,78 \text{ м}^3$

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		65

За ГОСТ 20680-86 серед вертикальних апаратів з механічним перемішуючим пристроєм і верхнім розташуванням приводів було обрано апарат з еліптичним днищем і еліптичною кришкою, що знімається (тип 0).

За ГОСТ 20680-86 задаємось наступними параметрами:

$$D_{\text{вн}} = 1800 \text{ мм} = 1,8 \text{ м}$$

$$H = 2780 \text{ мм} = 2,78 \text{ м}$$

За ГОСТ 6533-78, згідно зі значенням внутрішнього діаметру, задаємось наступними параметрами:

- Висота еліптичної частини днища:

$$h_{\text{ел}} = 0,25 \cdot D_{\text{вн}}$$

$$h_{\text{ел}} = 0,25 \cdot 1,8 = 0,45 \text{ м}$$

- Висота основи еліптичного днища:

$$h_{\text{осн}} = 100 \text{ мм} = 0,1 \text{ м}$$

- Внутрішня поверхня еліптичного днища:

$$F = 3,74 \text{ м}^2$$

- Товщина стінки еліптичного днища:

$$s = 10 \text{ мм} = 0,01 \text{ м}$$

- Об'єм еліптичного днища:

$$V = 861,7 \text{ м}^3$$

- Повна висота днища:

$$h = h_{\text{ел}} + h_{\text{осн}}$$

$$h = 0,45 + 0,1 = 0,55 \text{ м}$$

Повний об'єм:

$$V = V_{\text{ц}} + 2V_{\text{дн}} \Rightarrow V_{\text{ц}} = V - 2V_{\text{дн}}$$

$$V = 6,3 - 2 \cdot 0,8617 = 4,5766 \text{ м}^3$$

Висота циліндричної частини:

$$H_{\text{ц}} = V_{\text{ц}} / F = V_{\text{ц}} \cdot 4 / \pi \cdot D_{\text{вн}}^2$$

$$H_{\text{ц}} = 4,5766 \cdot 4 / 3,14 \cdot 1,8^2 = 1,799 \text{ м}$$

Загальна висота апарату:

$$H_{\text{заг}} = H_{\text{ц}} + 2h_{\text{дн}}$$

$$H_{\text{заг}}=1,799+2\cdot0,55=2,899 \text{ м}$$

5.2.2 Тепловий розрахунок

1. Внутрішній діаметр ферментера, $D=1,8 \text{ м}$
2. Внутрішній діаметр сорочки ферментера, $D_1 = 2 \text{ м}$
3. Товщина стінки ферментера, $S=0,01 \text{ м}$
4. Діаметр мішалки, $d_m=0,9 \text{ м}$
5. Тип перемішуючого пристрою – турбінна відкрита мішалка
6. Число обертів мішалки, $n=2 \text{ с}^{-1}$
7. Коефіцієнт заповнення, $K_3 = 0,6$
8. Об'єм апарату:

- Номінальний – $6,3 \text{ м}^3$;
- Робочий – $3,78 \text{ м}^3$

9. Температура середовища:

- Культурального (в середині ферментера), $t_k = 30^\circ\text{C}$
- На вході в рубашку, $t_1 = 20^\circ\text{C}$
- На виході з рубашки, $t_2 = 27^\circ\text{C}$

10. Час культивування – 120 год

11. Основними компонентами поживного середовища є мальтоза і крохмаль, тому тепловий ефект будемо розраховувати за ними. Вміст крохмалю: 1% об від об'єму поживного середовища, вміст мальтози: 1% об від об'єму поживного середовища

12. Кількість посівного матеріалу (інокуляту) (ПМ) $\sim 10\%$ від об'єму заповнення ферментера: $V_{\text{пм}}=3,78\cdot0,1=0,378 \text{ м}^3$

13. Кількість поживного середовища: $V_{\text{пс}}=V_p - V_{\text{пм}}=3,78 - 0,378 = 3,402 \text{ м}^3$.

14. Густина середовища: $\rho_{\text{пс}}=1540 \text{ кг/м}^3$ (по мальтозі)

15. Динамічна в'язкість середовища: $\mu_{\text{пс}}=1,5\cdot10^{-3} \text{ Па}\cdot\text{с}$

16. Теплоємність середовища, при $t=30^\circ\text{C}$, $c_1=4185 \text{ Дж/(кг}\cdot\text{K)}$

17. Коефіцієнт теплопровідності культури при $t=30^\circ\text{C}$, $\lambda_1=0,57 \text{ Вт/(м}\cdot\text{K)}$

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		67

18. Маса поживного середовища: $m = V_{\text{пс}} \cdot \rho_{\text{пс}} = 3,78 \cdot 1540 = 5,821 \text{ кг}$

19. Маса компонентів ПС (Крохмалю і мальтози): $m_{\text{м і к}} = 5,821 \cdot 0,01 = 0,05821 \text{ кг}$

20. Значення середньої температури води в сорочці, $t_{\text{ср}} = 23,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$

21. Густина води при середній температурі води, $\rho_2 = 998 \text{ кг/м}^3$

22. Кінематична в'язкість води при середній температурі, $\mu_2 = 1,1 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2/\text{с}$

23. Теплоємність води при середній температурі, $c_2 = 4190 \text{ Дж/(кг} \cdot \text{К)}$

24. Коефіцієнт динамічної в'язкості води при середній температурі, $\mu_2 = 1,050 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$

25. Теплопровідність води при середній температурі води, $\lambda_2 = 59,5 \cdot 10^{-2} \text{ Вт/м} \cdot \text{К}$

26. Коефіцієнт теплопровідності стінки $\lambda_{\text{ст}} = 58,15 \text{ Вт/м} \cdot \text{К}$

Визначення кількості тепла, що виділяється в процесі розвитку культури грибів.

Для спрощення розрахунків приймаємо, що тепловиділення протягом всього часу культивування відбувається рівномірно, тоді кількість теплоти, що виділяється культурою: $Q = \frac{m}{1800} \cdot \frac{q}{\tau_{\text{к}}}, \text{ Вт}$

В процесі гідролізу із 1 г/моль мальтози виділяється 392,6 кДж, а з 1 г/моль крохмалю 981,5 кДж. Маса 1 г/моль мальтози – 0,324 кг, маса 1 г/моль крохмалю – 0,81 кг.

Тепловиділення: мальтози $392,6/0,324 = 1211,7 \text{ кДж/кг}$

крохмалю $981,5/0,81 = 1211,5 \text{ кДж/кг}$

загальне: $1211,7 + 1211,5 = 2423,2 \text{ кДж/кг}$

$$Q_c = \frac{0,05821}{1800} \cdot \frac{2423,2 \cdot 10^3}{20} = 3,92 \text{ Вт}$$

Визначення кількості охолоджуючої води. Для уникнення перегріву середовища тепло, що виділяється, відводять. Тепло відводять охолоджуючою водою, повітрям, а також через втрати в навколишнє середовище.

Тепловий баланс ферментера:

$$Q_1 = Q_{\text{вод}} + Q_{\text{пов}} + Q_{\text{вт}}$$

де Q_1 – кількість теплоти, що виділяється біомасою; $Q_{\text{вод}}$ – кількість теплоти, що відводиться охолоджуючою водою; $Q_{\text{пов}}$ – тепло, що відводиться повітрям (в розрахунках можна не враховувати, так як його величина незначна, оскільки повітря, що йде на аерацію, подається в апарат з температурою, близькою до температури середовища) $Q_{\text{вт}}$ – втрати тепла в навколишнє середовище.

Втрати тепла в навколишнє середовище приймаємо рівними 2% від Q_1 :

$$Q_{\text{вт}} = Q_1 \cdot 0,02 = 3,92 \cdot 0,02 = 0,0784 \text{ Вт}$$

Тепло, що відводиться водою:

$$Q_{\text{вод}} = Q_1 - Q_{\text{вт}} = 3,92 - 0,0784 = 3,8416 \text{ Вт}$$

Витрати води для відводу тепла:

$$G_{\text{вод}} = \frac{Q_{\text{вод}}}{c(t_2 - t_1)} = \frac{3,8416}{4183(27 - 20)} = 0,00011 \text{ кг}$$

Визначення площі поверхні охолодження ферментера.

$$F = \frac{Q_{\text{вод}}}{k \Delta t_{\text{ср}}}$$

де k – коефіцієнт теплопередачі від середовища в ферментері до води в сорочці;

$\Delta t_{\text{ср}}$ – середня різниця температур теплоносіїв.

Розрахуємо коефіцієнт тепловіддачі від рідини, що переміщується, до стінки. Для апаратів з рубашками при перемішуванні мішалкою коефіцієнт тепловіддачі від середовища, що переміщується, до стінки визначають з рівняння:

$$Nu_1 = 0,36 Re_1^{0,67} Pr^{0,33} (\mu_1 / \mu_c)^{0,14}$$

де Re – критерій Рейнольдса, що характеризує співвідношення сил інерції та молекулярного тертя в потоці; Pr – критерій Прандтля, що характеризує фізичні властивості потоку, μ_1 та μ_c – динамічна в'язкість середовища при середній температурі рідини та при температурі стінки,

відповідно, так як різниця між ними не суттєва, приймаємо їх однаковими:

$$\mu_1 = \mu_c$$

Критерій Нуссельта, що характеризує інтенсивність тепловіддачі на межі потік – стінка:

$$Nu_1 = \frac{\alpha_1 D}{\lambda}$$

де α_1 - коефіцієнт тепловіддачі від рідини, що переміщується, до стінки

$$Re = \frac{\rho n d^2}{\mu_1} = \frac{1540 \cdot 1 \cdot 0,9^2}{1,5 \cdot 10^{-3}} = 831600$$

$$Pr = \frac{\mu_1 \cdot c_1}{\lambda_1} = \frac{1,5 \cdot 10^{-3} \cdot 4185}{0,57} = 11,013$$

Підставляємо отримані значення в формулу

$$Nu_1 = 0,36 \cdot 831600^{0,67} \cdot 11,013^{0,33} \left(\frac{1,5 \cdot 10^{-3}}{1,5 \cdot 10^{-3}} \right)^{0,14} = 7353,16$$

$$\alpha_1 = \frac{7353,16 \cdot 0,57}{1,8} = 2328,5 \text{ Вт/(м}^2 \cdot \text{К)}$$

Розрахуємо коефіцієнт тепловіддачі від стінки до охолоджуючої рідини:

$$\alpha_2 = 0,023 \frac{\lambda_2}{D+2s} \left(\frac{D_1}{D_1 - (D+2s)} \right)^{0,45} \left(\frac{W_B(D+2s)}{V_2} \right)^{0,8} \left(\frac{\mu_2 c_2}{\lambda_2} \right)^{0,43}$$

Швидкість води в сорочці ферментера:

$$W_2 = \frac{G_B}{\rho_2 f}$$

де f – площа перетину сорочки:

$$f = 0,785 (D_1^2 - (D + 2s)^2)$$

$$f = 0,785 (2^2 - (1,8 + 2 \cdot 0,01)^2) = 0,54 \text{ м}^2$$

Тоді швидкість води:

$$W_B = \frac{0,00011}{998 \cdot 0,54} = 0,2 \cdot 10^{-6} \text{ м/с}$$

Середня температура води:

$$t_{\text{сер}} = \frac{t_1 + t_2}{2} = \frac{27 + 20}{2} = 23,5^\circ \text{C}$$

За формулою розрахуємо значення коефіцієнта тепловіддачі від стінки до охолоджуючої рідини:

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
						70
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$\alpha_2 = 0,023 \frac{0,595}{(1,8+2 \cdot 0,001)} \left(\frac{2}{2-(1,8+2 \cdot 0,001)} \right)^{0,45} \left(\frac{0,005(1,8+2 \cdot 0,001)}{1,1 \cdot 10^{-6}} \right)^{0,8} \cdot \left(\frac{1,050 \cdot 10^{-3} \cdot 4190}{0,595} \right)^{0,43} = 0,023 \cdot 0,33 \cdot 4,14 \cdot 1351,032 \cdot 2,364 = 100,359$$

Вт/(м²·К)

Коефіцієнт теплопередачі від середовища в ферментері до охолоджуючої рідини:

$$k_m = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{\delta_{ст}}{\lambda_{ст}} + \frac{1}{\alpha_2}} = \frac{1}{\frac{1}{2328,5} + \frac{0,06}{58,15} + \frac{1}{100,359}} = \frac{1}{4,295 \cdot 10^{-4} + 0,001 + 0,0099} = 88,29 \text{ Вт/м}^2 \cdot \text{К}$$

З урахуванням забруднень стінок:

$$k = k_m \cdot 0,95 = 88,29 \cdot 0,95 = 83,87 \text{ Вт/м}^2 \cdot \text{К}$$

Площа поверхні охолодження:

$$F = \frac{3136}{83,87 \cdot 5,8} = 6,447 \text{ м}^2$$

5.2.3 Розрахунок перемішуючого пристрою

Для процесу виробництва біоетанолу з меляси найкраще підходить турбінна мішалка

$$D=1,8 \text{ м}$$

$$d_m=D/4=0,45 \text{ м}$$

Серед представлених мішалок стандартного ряду турбінних мішалок, наявна мішалка, діаметром 450 мм.

Повинні зберігатись основні параметри даної мішалки:

$$- D/d_m=3:4$$

$$- h_m/d_m=0,2$$

$$- h/d_m=0,4:1$$

$$- l/d_m=0,1$$

Геометричні розміри мішалки:

$$- \text{Висота: } h_m = d_m \cdot 0,2 = 0,45 \cdot 0,2 = 0,09 \text{ м}$$

$$- \text{Висота прикріплення: } h = d_m \cdot 0,6 = 0,27 \text{ м}$$

$$- \text{Ширина лопасті: } l = d_m \cdot 0,25 = 0,1125 \text{ м}$$

Окружна швидкість $w=2,5$ м/с. Приймаємо $w=3$ м/с.

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		71

Частота обертання: $n = \omega / \pi d_m = 3 / 3,14 \cdot 0,45 = 2 \text{ с}^{-1}$

Діаметр вала мішалки:

$$d_b = C \cdot d_m$$

де $C=0,117$ – для турбінної мішалки

$$d_b = 0,117 \cdot 0,45 = 0,05265 \text{ м}$$

Потужність, що витрачається на подолання тертя в торцевих ущільненнях[42]:

$$N_{\text{ущ}} = 6020 \cdot d_b^{1,3} = 6020 \cdot 0,05265^{1,3} = 131,05 \text{ Вт}$$

В залежності від $Re_{\text{перем}}$ задаємось критерієм K_N – критерій потужності, для турбінної мішалки: $K_N=6$ [43].

Потужність, що витрачається на перемішування:

$$N = K_N \cdot \rho \cdot n^3 \cdot d_m^3 = 6 \cdot 1540 \cdot 3^3 \cdot 0,45^5 = 4603,61 \text{ Вт}$$

Коефіцієнт висоти рівня рідини: $k_n = 1,05$

Потужність електродвигуна:

$$N = \frac{k_n \cdot k_n \cdot N + N_{\text{ущ}}}{\eta}$$

де k_n – коефіцієнт, що враховує наявність внутрішніх пристроїв в апараті, для апаратів с перегородками $k_n=1$

Обираємо стандартний двигун потужністю 22 кВт.

$$N = \frac{1,1 \cdot 4603,61 + 1322,6}{0,45} = 16062 \text{ Вт}$$

5.2.4 Розрахунок барботера

Виконуємо розрахунок геометричних розмірів барботера.

Висота перемішуючого пристрою над барботером дорівнює:

$$h_6 = 0,25 d_m$$

$$h_6 = 0,25 \cdot 0,45 = 0,1125 \text{ м}$$

Діаметр барботера знаходимо із співвідношення:

$$D_0 = (0,5 \div 0,75) d_m$$

$$D_0 = 0,75 \cdot 0,45 = 0,3375 \text{ м}$$

Приймаємо діаметр отворів барботера 3 мм:

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		72

$$d_0 = 3 \text{ мм} = 0,003 \text{ м}$$

Кількість отворів у барботері:

$$z_{\text{отв}} = \frac{4V_{\Gamma}}{\pi d_0^2 W_0}$$

$$z_{\text{отв}} = \frac{4 \cdot 0,01665}{3,14 \cdot 0,003^2 \cdot 20} = 118 \text{ отворів}$$

Кількість отворів в одному ряду дорівнює:

$$z_{\text{отв1}} = \frac{\pi D_0}{t_{\text{отв}}}$$

$$z_{\text{отв1}} = \frac{3,14 \cdot 0,3375}{0,01} = 106 \text{ отворів}$$

Сума поперечного перерізу отворів барботера:

$$S_{\text{отв}} = \frac{\pi d_0^2}{4} \cdot z_{\text{отв}}$$

$$S_{\text{отв}} = \frac{3,14 \cdot 0,003^2}{4} \cdot 118 = 0,83 \cdot 10^{-3} \text{ м}^2$$

5.3 Вибір загальнозаводського обладнання

Для нормального, стабільного функціонування ферментеру необхідно здійснювати ряд операцій, а саме подавати середовище у ферментер, теплоагент в сорочку, перемішувати, подавати повітря в реактор. Для ефективності виробництва необхідно здійснити правильний вибір обладнання.

Подача води в сорочку для охолодження може здійснюватись електронасосом. Для вибору електронасоса необхідно зробити наступні розрахунки.

1. Потужність, що витрачається на перекачування води:

$N_n = G_{\text{вод}} \cdot H \cdot g$, де $G_{\text{вод}}$ – витрати води для відводу тепла, кг/с, H – напір, м (приймаємо за 10), g – прискорення вільного падіння, м/с².

$$N_n = 0,00011 \cdot 10 \cdot 9,81 = 0,011 \text{ (кг/м}^2\text{)/с}$$

2. Потужність електродвигуна:

$N_e = N_n / \eta \cdot \eta_{\text{пер}}$, де, η – ККД насоса (0,8), $\eta_{\text{пер}}$ – коефіцієнт корисної дії передачі (1)

$$N_e = 0,011 / 0,8 \cdot 1 = 0,014 (\text{кг/м}^2) / \text{с}$$

Згідно обрахованих даних і ГОСТ 20791-88 обираємо електронасос центробіжний герметичний ЦГ6,3/12,5. Завдяки своїй конструкції, такі насоси не допускають можливості інфікування середовища. Крім того, підшипники змазуються рідиною, яка перекачується, завдяки чому не забруднюються матеріалом для змазування. Згідно розрахунків обрано редуктор ВД-IV 7/48 4500 та електродвигун АИР100S2.

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

До апаратів з перемішувачими пристроями виносяться наступні вимоги безпеки:

- Для забезпечення безпеки експлуатації апарати повинні відповідати вимогам ГОСТ 12.2.003 та ГОСТ 12.2.007, а також документам, що складаються на кожен апарат конкретного типу. Апарати, що працюють за надлишкового тиску, повинні відповідати вимогам ПБ 10-115-97;
- Персонал, що обслуговує той чи інший апарат, повинен бути захищений від впливу таких шкідливих та небезпечних факторів як підвищений тиск середовища в апараті, підвищена вібрація та шум, зіткнення з рухомими та гарячими частинами апаратів, небезпечної значення електричного струму та високих потенціалів статичної електрики, вибухів, загорянь;
- Апарати мають бути герметичні відносно зовнішнього середовища. Ступінь герметичності, а також методи її дослідження визначаються згідно ГОСТ 26-11-14;
- На апаратах, що вміщують невибухонебезпечні речовини і речовини, що віднесені до 4 класу безпеки по ГОСТ 12.1.007(речовини

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		74

малонебезпечні), допустиме використання одинарних торцевих сальникових ущільнювачів і гідрозатворів;

- Корпуси апаратів та їх зйомні одиниці, що працюють в умовах надлишкового тиску, мають бути захищені від надмірного підвищення тиску запобіжниками – пружинними клапанами прямої дії, або запобіжними мембранами, які встановлюються прямо на апараті, чи трубопроводі, який під'єднаний до апарату;
- Вибір електрообладнання треба здійснювати згідно з вимогами «Правила влаштування електроустановок. Вид. 6-е, 1986», а заземлення повинне відповідати вимогам ГОСТ 12.1.030, ГОСТ 12.1.038, ГОСТ 12.2.007.0 [44]
- Температура зовнішніх поверхонь апаратів, термоізоляційних покриттів, які можуть знаходитись у прямому контакті з робочими місцями і обслуговуючим персоналом, має бути не більше 45°C при установці апарата всередині приміщення, і не більше 60°C при встановленні апаратів ззовні.

Будь – які роботи, що проводяться з апаратами на промисловості мають відповідати всім вимогам, наведеним у «ССБТ. Процессы производственные. Общие требования безопасности» та ГОСТ 121004-91[45].

Норми перевіряються за наступними параметрами:

- рівень шуму і вібрацій;
- освітленість робочого місця;
- запиленість приміщення;
- загазованість приміщення;
- фізичні характеристики;
- вміст шкідливих речовин за ГДК, які вказані у ГОСТ 12.1.005-88 «ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		75

На будь – якому біотехнологічному підприємстві повинна регулярно проводитись комплексна профілактика, яка включає в себе вдосконалення технологічного обладнання, ефективну роботу вентиляційної системи, забезпечення герметичності обладнання, перевірка якості переробки відходів і максимальна мінімізація відходів.

Проводиться регулярний обов'язковий лабораторний контроль вмісту шкідливих хімічних речовин у повітрі робочої зони. Їх кількість не повинна перевищувати вказані регламентовані норми. Особливе місце займає боротьба із шумом та вібрацією. Використовуються спеціальні протишумні, віброгасильні пристрої і матеріали, правильне планування виробничих приміщень, щмопоглинальні будівельні матеріали. Також працівники забезпечуються індивідуальними засобами захисту. Працівникам грамотно komponують робочий день, поєднуючи час праці і відпочинку.

Основними несприятливими факторами біотехнологічних виробництв, особливо підприємств з випуску білкововітамінних концентратів і ферментних препаратів, є живі і мертві мікроорганізми, продукти їх життєдіяльності, пил білка, а також хімічно активні речовини, що надходять до органів дихання у вигляді аерозолів, або забруднюючи відкриті ділянки тіла.

Щоб попередити забруднення атмосфери використовують герметизацію виробничих апаратів, а також використовують такі очисні прилади, як циклони, гідроциклони, пилоосаджуючі камери, тканинні і електричні фільтри, скрубери.

Важливою також є стерилізація стічних вод, адже вони можуть містити живу мікрофлору та шкідливі продукти життєдіяльності мікроорганізмів. Спосіб очистки обирається на основі аналізу складу стічних вод.

Забрудненість стічних вод оцінюється зазвичай двома показниками:

- 1) хімічним поглинанням кисню (ХПК) – кількістю кисню (мг), якої досить для повного хімічного окислення всіх забруднень в 1 л стоку;
- 2) біологічним поглинанням кисню (БПК) – кількістю кисню (мг), яке

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		76

споживається мікроорганізмами для окислення органічних речовин в одному літрі стоку.

У промислових умовах спочатку стічні води механічно очищують, після цього проціджують крізь сітки, відфільтровують, відстоюють, обробляють у гідроциклонах, проводять флотацію до того моменту, доки ступінь очистки не досягне значення 50-70%. В кінці до води можуть застосовуватися такі види очистки як оброблення вапном, хлорування та озонування. Завдяки цьому досягається ступінь очистки 80-90%. Також, замість хімічного способу, можна застосовувати фізико – хімічний, із використанням адсорбентів. Є процеси, в основі яких лежить ультрафільтрація, зворотній осмос і дистиляція. Такі види очищення забезпечують ступінь очистки 90 – 95% [46].

Відпрацьоване повітря перед надходженням в атмосферу чистять за допомогою сітчастих фільтрів. Повітря, що проходить крізь фільтр, звільняється від частинок культуральної рідини з мікроорганізмами. Ефективність такої очистки складає 99,6%.

					ДП 6202. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		77

ВИСНОВКИ

У дипломному проекті запропоновано технологію виробництва препарату Амілоризин Г10Х (грибна альфа-амілаза) з високим значенням показника амілолітичної активності, фасована zip-lock пакети вагою один кілограм.

1. Обґрунтовано вибір штаму-продуценту *Aspergillus oryzae*, що володіє високою здатністю до синтезу обраного фермента. Обрано схему отримання промислових штамів шляхом відбору активних варіантів і застосування фізичного мутагену (УФ – випромінювання).

2. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуценту встановлені оптимальні умови культивування. Запропоновано метод глибинного культивування на середовищі, основними компонентами якого є крохмаль і мальтоза, рН – 3,5 – 4,0, оптимальна температура - 30°C, аерація. Такий спосіб виробничого культивування є більш простим, і при цьому не впливає на якість вихідного продукту.

3. Удосконалено технологічну схему, що враховує особливості культивування з метою отримання ферментного препарату альфа-амілази з *Aspergillus oryzae* M.

4. Складено матеріальний баланс виробництва.

5. Для реалізації технологічного процесу було складено апаратурну схему виробництва та підібрано відповідне апаратурне обладнання яке є максимально автоматизованим.

6. Обґрунтовано вибір конструкції ферментера об'ємом 6,3 м³, з турбінною мішалкою. Технологічний та конструктивний розрахунки підтверджують плановану надійність апарату.

7. У проекті передбачено всі необхідні вимоги щодо охорони праці та

					ДП 6202. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Вершиніна К.Ю.			ВИСНОВКИ	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	78
							85
Керівник		Литвина Г. С.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ	
Затвер.							

охорони навколишнього середовища на виробництві пов'язаному з отриманням ферментного препарату.